

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

São Luís
2008

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco

São Luís
2008

Silva, Verônica Alves Gonçalves da

Desenvolvimento de metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos/ Verônica Alves Gonçalves da Silva. São Luís, 2008.

130f.

Orientador: Teresa Cristina R. dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Química. São Luís, 2008.

1. Mel – resíduos de sulfonamidas. 2. Produção de mel. 3. Extração em fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina R. dos Santos, orient. II. Título.

CDU 658.56:638.14.06

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^ª. Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco
(Orientadora)**

**Prof^º Dr. Laerte da Cunha Azeredo
(DEQUI/UFRRJ)**

**Prof^º Dr. Fernando Carvalho
(DETEQUI/UFMA)**

A Deus e a Nossa Senhora...

Aos meus pais: Maria da Penha Alves da Silva
e Êulete Gonçalves da Silva.

Ao meu amor, Fábio Silveira Vidal.

À minha sobrinha: Iracema D'monik Miranda
Gonçalves da Silva.

E ao meu irmão Fabrício C. G. da Silva.

Por todo amor, carinho e paciência.

E pelo incansável incentivo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos memoráveis, coisas inexplicáveis e pessoas inesquecíveis”.

Ao nosso Deus, Todo Poderoso, meu Mestre, meu Pastor, meu Senhor, por ter me dado coragem para superar todas as dificuldades, por nunca me desamparar!... A Nossa Senhora, que tanto me inspira, em todos os momentos, tirando-me de todas as dificuldades e levando-me a serenidade.

Aos meus pais, que me fornecem a força necessária para tudo na minha vida, por terem me educado tão bem, ensinando-me valores essenciais para ser uma boa pessoa e uma profissional consciente e de muita ética. Agradeço ao meu pai pelo exemplo de pessoa culta e a minha mãe pelo exemplo de professora dedicada. Agradeço também à valiosa lição de sempre me mostrarem que sozinhos não somos nada, mas somos muito mais com a ajuda dos amigos.

Aos meus tios, tia Cida e tio Laerte, por desde cedo me ensinarem a amar a química e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada também por me ensinarem a superar obstáculos estudando.

Ao meu noivo Fábio Silveira Vidal, que tão pacientemente ouviu todas as minhas dúvidas, afagou minhas tristezas, pelo carinho, pelo companheirismo, pelas horas que passou comigo estudando química e pelo seu generoso amor que tanto me incentivou em todas as atividades sempre acreditando que eu iria conseguir.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, por me acolher tão carinhosamente, por seu incentivo durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório NARP pela convivência.

Ao amigo, José Crediciomar pelo apoio, incentivo, paciência (para me ensinar a utilizar o equipamento (HPLC)) e pela grande demonstração de amizade.

Aos meus amigos: Gilvan, Raphael e Álvaro, amigos que fiz e aonde quer que eu vá levarei em meu coração. Agradeço a cumplicidade e agradável convívio, as conversas e os bons momentos compartilhados. Raphael te agradeço mais ainda pela grande ajuda na finalização desta pesquisa, muito obrigada meu amigo!

A querida amiga e bibliotecária, Rosivalda Pereira, pela acolhida fantástica, pelas adoráveis e produtivas conversas na biblioteca do CCET e pela grande ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

A amiga Cláudia Guerra pela convivência, pelo carinho, amizade e por ser minha família em São Luís.

Ao Prof^o José Wilson pela amizade e orientação profissional, desde a disciplina de catálise continuando seus ensinamentos por todo o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química: Marise e Daniele, aos funcionários do Departamento de Tecnologia Química: Alba, Ivaldo e de outros setores da UFMA, em especial a Dona Eunice e Senhor Alberto, pela constante disposição em me ajudar na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“A pesquisa científica consiste em
ver o que todo mundo já viu, mas
pensar em algo que ninguém pensou
ainda”.*

(Albert Szent-Györgyi)

RESUMO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável, não sendo permitido a presença de aditivos e/ou agentes conservadores. Na apicultura as sulfonamidas são muito utilizadas na prevenção e controle de doenças em colméias, como a cria pútrida americana causada pelo *Paenibacillus larvae*. Uma consequência desta prática é a presença destes resíduos no mel, o que pode causar reações alérgicas nos consumidores. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas no mel. No Brasil, a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A realização de programas de monitoramentos de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando possíveis danos à saúde do consumidor. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico multiresidual para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel de abelhas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A metodologia estabelecida consistiu nas seguintes condições: extração em fase sólida com sorvente Nexus, eluição com 5 mL de acetonitrila e reconstituição com solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, com adição de 1% de metanol, separação em coluna analítica C18, fase móvel acetonitrila e água, no modo de eluição em gradiente e detecção a 278 nm. O preparo de amostra consistiu na hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} de uma alíquota de mel e ajuste para pH 4,5 com solução tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. O método foi validado e os resultados demonstraram exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Foi encontrada boa faixa de linearidade, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 41 a 89% e estimativa do desvio padrão relativo variando entre 2,36 e 14% para os quatro compostos estudados. Os limites de detecção das quatro sulfas em amostra de mel variaram de 20 a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 60 a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para as concentrações totais de SDZ, STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite adequada determinação das quatro sulfas em amostras de mel de abelhas.

Palavras-chave: Sulfonamidas. CLAE-DAD. Extração por fase sólida. Validação. Mel.

ABSTRACT

Honey is a natural substance produced by bees and by your nature it is considered a healthy product. Presence of additives and/or preserve agents is not permitted. On apiculture, sulfonamides are largely used on prevention and control of beehive disease, such as American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. A consequence of this practice is the presence of these residues in honey, that should cause allergy reactions on consumers. In the last years, some published works is discussing the presence of antibiotic and sulfonamides residues in honey. In Brazil, the presence of antibiotics residues in food is controlled by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and by the Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). The realization of monitoring contaminants residues in food programs, as well as the Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) from MAPA are essentials to the sanitary vigilance actions development, preventing and controlling possible hazard to the consumer health. This work has the objective the development and validation of multiresidue analytical method to the sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidine and sulfadimethoxine determination in bee honey using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). The established methodology consisted on such conditions: solid phase extraction with Nexus sorbent, elution with acetonitrile 5 mL, and reconstitution with sodium acetate buffer (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5, with 1% methanol addition, separation on analytical column C18, acetonitrile and water mobile phase, on gradient elution mode and detection on 278 nm. The sample preparation consisted on the acid hydrolysis with hydrochloric acid 2 mol L⁻¹ of a honey rate and adjust to pH 4,5 with sodium acetate buffer solution 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5. The method was validated and the results demonstrated accuracy and precision between the limits established by the current legislation. Good linearity range was encountered, obtaining recovery values varying from 41 to 89% and relative standard deviation estimative varying between 2,36 and 14% to the four studied compounds. The four sulfonamides detection limits in honey sample varying from 20 to 30 µg kg⁻¹ and the quantification limits varied from 60 to 90 µg kg⁻¹. Considering 100 µg kg⁻¹ the residue maximum limit established by the Brazilian legislation to the SDZ, STZ, SMZ and SDM total concentration, the described method permit suitable determination of the four sulfonamides in bee honey.

Keywords: Sulfonamides. HPLC-DAD. Solid phase extraction. Validation. Honey.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 2	Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.....	45
Quadro 3	Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.....	49
Quadro 4	Testes para seleção da composição da fase móvel.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição típica do mel.....	24
Tabela 2-	Propriedades gerais das sulfonamidas.....	27
Tabela 3-	Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.....	38
Tabela 4-	Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.....	64
Tabela 5-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	67
Tabela 6-	Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.....	74
Tabela 7-	Estudo da composição da fase móvel.....	80
Tabela 8-	Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.....	83
Tabela 9-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	87
Tabela 10-	Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)....	90
Tabela 11-	Resultados dos testes de eficiência de extração.....	91
Tabela 12-	Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.....	93
Tabela 13-	Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 14-	Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão.....	97
Tabela 15-	Parâmetros de validação para o método desenvolvido.....	98
Tabela 16-	Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.....	100
Tabela 17-	Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.....	102
Tabela 18-	Análise de amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de mel no Brasil.....	23
Figura 2	Diferentes tipos de mel.....	24
Figura 3	Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas: (a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.....	26
Figura 4	Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida)...	27
Figura 5	Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.....	28
Figura 6	(a) Esquema de cartucho para EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.....	44
Figura 7	Principais etapas empregadas EFS.....	45
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.....	50
Figura 9	Processo de fortificação das amostras.....	54
Figura 10	Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.....	59
Figura 11	(a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.....	60
Figura 12	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.....	63
Figura 13	Procedimentos experimentais empregados nas etapas de extração EFS.....	69
Figura 14	Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.....	72
Figura 15	Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.....	75
Figura 16	Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatógrafo: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm.....	76
Figura 17	Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, 1,0 mg L ⁻¹ , usando C ₁₈ (cromatograma vermelho), C ₈ (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).....	77
Figura 18	Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto).....	78
Figura 19	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água.....	81

Figura 20	Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,5.....	82
Figura 21	Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L ⁻¹	84
Figura 22	Estudo da degradação das soluções-padrão.....	84
Figura 23	Esquema da reação açúcar-sulfonamida.....	86
Figura 24	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , sem hidrólise ácida.	88
Figura 25	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , com hidrólise ácida.	89
Figura 26	Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de <i>clean-up</i>	92
Figura 27	Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹	93
Figura 28	Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.....	95
Figura 29	Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).....	96
Figura 30	Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de 100 ng g ⁻¹	100
Figura 31	Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá	102
Figura 32	Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.....	103
Figura 33	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins.....	103
Figura 34	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí.....	103
Figura 35	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L ⁻¹) pH 4,5/Metanol.....	129
Figura 36	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
C8	Fase estacionária do tipo octilsilano
CODEX	<i>Codex Alimentarius</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido com detector por arranjo de fotodiodos
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
CL	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida - EFS)
t _R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Detector por absorbância no ultravioleta-visível

LISTA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
STZ	Sulfatiazol
SAD	Sulfanilamide
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SID	Sulfisomidina
SMTX	Sulfametoxazol
SDM	Sulfadimetoxina
SBM	Sulfabenzamida
SDX	Sulfadoxina
SQX	Sulfaquinoxalina
SME	Sulfameter
SMX	Sulfamoxol
SMP	Sulfametoxipiridazina
SCP	Sulfacloropiridazina
SSZ	Sulfasalazina
SMDZ	Sulfametoxidiazina
SMTT	Sulfametiltiazol
SMM	Sulfamonometoxina
SAI	Sulfisoxazol
SCT	Sulfacetamida
SGN	Sulfaguanidina
SMT	Sulfametizol
STR	Estreptomicina
DHS	Diidroestreptomicina
CAP	Cloranfenicol
OTC	Oxitetraciclina
AMP	Ampicilina
TC	Tetraciclina
DMC	Democlociclina
CTC	Clorotetraciclina
NEO	Neomicina
PENG	Penicilina G
SPI	Espiramicina
DC	Doxiciclina
PEN	Penetamato
DES	Desmicosina
OLE	Oleandomicina
TIL	Tilmicosina
TYL	Tilosina
OXA	Oxacilina
EA	Eritromicina
CLOX	Cloxacilina
NAF	Naficilina
DIC	Dicloxacilina
ROXI	Roxitromicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µ	Micron
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	Minuto
sec	Segundo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
R ²	Coeficiente de Determinação ou de Correlação Múltipla ou Eficiência da Regressão
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Amostral
t	t de <i>Student</i>
$\bar{X}$	Média aritmética
x _i	Valor Medido
Σ	Somatório
√	Raiz quadrada
σ	Desvio padrão da população

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	22
1.1.1	Características físico-químicas do mel.....	23
1.1.2	Doenças nas abelhas e na colméia.....	25
1.2	SULFONAMIDAS.....	26
1.2.1	Resíduos de sulfonamidas no mel.....	29
1.2.2	Aspectos da legislação.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS.....	35
3.1	PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	43
3.1.1	Extração por Fase Sólida (EFS).....	43
4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.1	FAIXA DE APLICAÇÃO.....	49
4.2	LINEARIDADE.....	51
4.3	SELETIVIDADE.....	51
4.4	PRECISÃO.....	52
4.4.1	Repetitividade.....	52
4.4.2	Precisão intermediária.....	53
4.4.3	Reprodutibilidade.....	53
4.5	EXATIDÃO.....	53
4.5.1	Recuperação.....	54
4.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	55
4.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	56
5.	MATERIAIS E MÉTODO.....	58
5.1	METODOLOGIA.....	58
5.1.1	Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas.....	58
5.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	60

5.2.1	Padrões.....	60
5.2.2	Reagentes e Solventes.....	60
5.2.3	Dispositivos para Extração por Fase Sólida.....	60
5.2.4	Coluna Cromatográfica.....	61
5.2.5	Equipamentos.....	61
5.2.6	Outros materiais.....	62
5.3	MÉTODO.....	62
5.3.1	Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas.....	63
5.3.1.1	Seleção da coluna.....	64
5.3.1.2	Linha de Base do Solvente.....	64
5.3.1.3	Conformidade do Sistema.....	64
5.3.1.4	Seleção do Comprimento de onda.....	65
5.3.1.5	Seleção da fase móvel.....	65
5.3.1.6	Preparação dos padrões.....	65
5.3.2	Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração.....	66
5.3.2.1	Pré-tratamento da amostra.....	66
5.3.2.2	Seleção do adsorvente.....	67
5.3.2.3	Condicionamento dos cartuchos.....	67
5.3.2.4	Eluição dos analitos.....	68
5.3.2.5	Extração por EFS.....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	69
5.4.1	Seletividade.....	70
5.4.2	Linearidade.....	70
5.4.3	Limites de Detecção e de Quantificação.....	70
5.4.4	Estudo de recuperação.....	71
5.4.4.1	Precisão.....	71
5.4.4.2	Exatidão.....	71
5.5	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1	SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	74
6.2	SELEÇÃO DA COLUNA.....	77
6.3	SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	77
6.3.1	Seleção do pH da fase móvel.....	78

6.3.2	Composição da fase móvel.....	79
6.3.3	Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho.....	82
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	83
6.5	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS.....	85
6.5.1	Pré-tratamento da amostra.....	85
6.5.2	Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração em fase sólida.....	90
6.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	94
6.6.1	Conformidade do sistema.....	94
6.6.2	Seletividade.....	95
6.6.3	Curva analítica.....	96
6.6.4	Faixa linear, linearidade, sensibilidade.....	97
6.6.5	Limites de detecção e quantificação.....	97
6.6.6	Precisão e Exatidão.....	98
6.6.6.1	Precisão.....	98
6.6.6.2	Exatidão.....	99
6.6.6.3	Avaliação estatística do método.....	101
6.7	ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	101
7.	CONCLUSÃO.....	106
8.	REFERÊNCIAS.....	108
9.	ANEXOS.....	127
9.1	ANEXO 1.....	127
9.2	ANEXO 2.....	128
9.3	ANEXO 3.....	129

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável. A adição de aditivos e agentes conservadores no mel não é permitida. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas em mel. Antibióticos são principalmente usados na apicultura para o tratamento de doenças bacterianas ou outros tipos de doenças infecciosas [1].

Para aceitação do produto apícola, no Brasil, é necessário que o produto obedeça ao regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A legislação vigente é descrita na Instrução Normativa N. 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [2]. A citada norma define tipos de mel, procedimento de obtenção, apresentação e/ou processamento, além de estabelecer limites para os dez principais parâmetros físico-químicos, importantes na avaliação da pureza, maturidade e possível adulteração do mel.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro no mercado externo, é necessário que o produto cumpra as exigências estabelecidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), mais especificamente do Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM [3]. O programa visa atender às exigências do mercado externo, em especial da Comunidade Européia, responsável por mais de 90% da exportação de mel brasileiro e estabelece, dentre outras coisas, a avaliação quanto à presença de resíduos no produto, o potencial da utilização inadequada de drogas no produto e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas. Várias classes de substâncias tóxicas são incluídas neste programa, mais especificamente organoclorados, antibióticos, metais pesados, substâncias promotoras de crescimento, tireostáticos e sulfonamidas.

A ausência de controle de resíduos no mel brasileiro foi a principal justificativa para o embargo ocorrido em 2006 na União Européia [4]. Uma das grandes preocupações do mercado apícola atual é a eliminação total de resíduos de antibióticos e defensivos agrícolas no mel. Utilizados para prevenir e tratar enfermidades nas abelhas e doenças de origem bacteriana na colméia fora da época de florada, os antibióticos, se utilizados sem o devido controle, podem causar prejuízos a qualidade do mel. A restrição do comércio internacional baseia-se no fato de que tais substâncias poderiam atingir o consumidor, que estaria ingerindo o mel contaminado, acarretando danos à sua saúde, tais como, adaptação e resistência de

bactérias no organismo. Por este motivo é que, recentemente, alguns países compradores de mel têm incluído em suas exigências um produto apícola livre de antibióticos.

Embora o uso de antibióticos em colméias seja uma prática constante dos apicultores, o Brasil possui um grande diferencial no contexto mundial, visto que existem poucos registros de doenças comuns em abelhas, principalmente na região Nordeste.

Sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, na apicultura, são utilizadas no tratamento e prevenção da “cria pútrida” em abelhas, doença provocada pelo *Paenobacillus larvae*. Uma consequência direta do uso é a ocorrência de resíduos de sulfonamidas no mel de abelhas, o que compromete a qualidade do produto [5].

Estudos para estes compostos incluem procedimentos colorimétricos como a reação de Bratton-Marshall [6;7]; cromatografia em camada delgada (CCD) [8], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) [9, 10; 11; 12; 13; 14; 15 e 16, dentre outros], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) [17; 18; 19; 20 e 21, dentre outros] espectrometria de massas no modo “tandem” (CLAE-EM ou CLAE-EM/EM) [22; 23; 24; 25; 26; 27 e 28, dentre outros].

A literatura atualmente disponível para análise de sulfonamidas em mel ressalta a especificidade da matriz com relação à aplicação de métodos analíticos. No Brasil, existem poucos trabalhos com sulfonamidas em mel. A disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos apícolas, quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, é essencial para fornecer aos apicultores garantias sobre a qualidade de seu produto, garantindo-lhes condições de exportar. Pelo exposto é que veio o interesse em fazer esta pesquisa. Este trabalho também poderá ser utilizado como um incentivo na realização de novos estudos envolvendo sulfonamidas em alimentos (matrizes diferentes de mel).

1.1 MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS

O Brasil tem um grande potencial apícola, devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variedade edafoclimática existente, o que possibilita produzir mel o ano todo [29]. A apicultura é uma atividade que se enquadra no tripé da sustentabilidade podendo favorecer programas de desenvolvimento econômico, social e ecológico como os existentes no Nordeste brasileiro. Em 2004 o Brasil alcançou a posição

de 11º produtor mundial de mel (40 mil toneladas) e o 5º exportador mundial (21 mil toneladas). No cenário mundial, os principais produtores de mel são China, Estados Unidos e Argentina e os maiores exportadores são China, Argentina, México e Alemanha. No Mercosul, o Brasil é superado apenas pela Argentina. A produtividade brasileira ainda é baixa [3].

Dos produtos apícolas o mel é o que tem maior destaque para o comércio. A região Sul é a principal região produtora de mel no país com 47,72%. A região Nordeste vem na segunda posição com 31,58% da produção, seguida das regiões Sudeste (16,22%), Centro-Oeste (2,87%) e Norte (1,62%) [3].

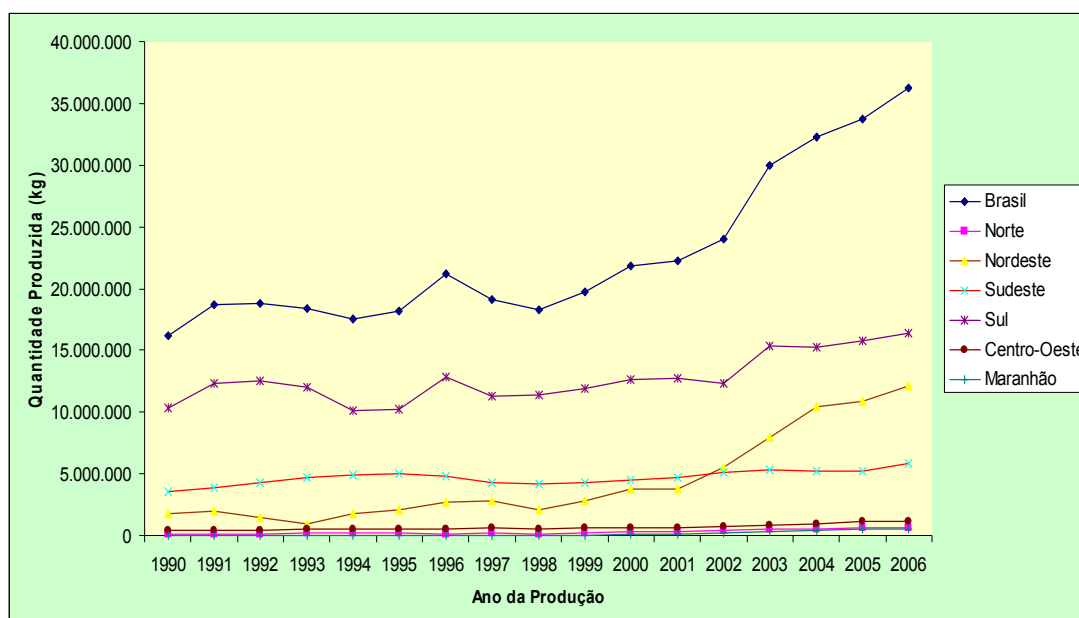


Figura 1 – Produção de mel no Brasil.

Fonte: adaptado de [30]

Segundo dados do IBGE [31] o Maranhão, no ano de 2005, passou a ocupar a 10ª posição no *ranking* nacional, tendo alcançado um aumento de produção de 289 % em relação à estatísticas realizadas pelo mesmo órgão no ano de 2001, comprovando-se o grande potencial de produção do estado.

1.1.1 Características físico-químicas do mel

O mel (Figura 2) é um produto biológico muito complexo, devido a sua composição variar com a flora e ser influenciado pelas condições climáticas e edafológicas da

região onde foi produzido [32]. Segundo Crane [33] mel é o resultado da desidratação e transformação do néctar, portanto a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar.



Figura 2- Diferentes tipos de mel.
Fonte: Internet: [34]

A composição físico-química do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais também estão diretamente relacionados com a fonte do néctar que o originou e assim como com a espécie da abelha que o produziu [32]. A Tabela 1 apresenta uma visão geral da composição química do mel.

Tabela 1 - Composição típica do mel.

Componente	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76-1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 -40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020-1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	----
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68-59,49	10,33
Proteína (%)	0,1686	0,0577-0,567	7,09

Fonte: NATIONAL HONEY BOARD [35].

Sabor e aroma. O sabor e aroma característicos do mel são conferidos pela presença dos compostos voláteis. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado

diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-los dos favos [36]. Os aromas podem ser classificados em característico, adocicado, floral, cera e queimado. Já o sabor pode ser classificado como característico, adocicado, floral, cera, queimado, ácido e residual.

Cor. “A coloração do mel” é normalmente interpretada como algo mais escuro que creme e mais claro que marrom. A cor do mel líquido pode realmente variar de branco-aquoso a próximo de preto, com variantes tendendo para matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul [33].

Água. O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% [37]. Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. A quantidade de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade [32].

Açúcares. O poder adoçante do mel é avaliado em cerca da metade do atribuído ao mesmo peso de açúcar de cana [33]. Além da doçura, os açúcares são responsáveis por outras características, tais como: capacidade de conservação, poder higroscópico e habilidade de promover cor e sabor [38]. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5% a 40% para a glicose e de 36,2% a 49,6% para a frutose, de acordo com a florada [39].

Diversos. Outros componentes importantes presentes no mel são as enzimas, os aminoácidos, os ácidos orgânicos e minerais.

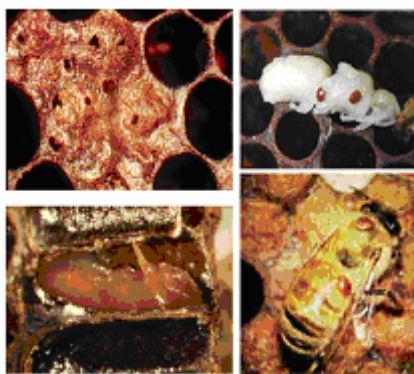
1.1.2 Doenças nas abelhas e na colméia

Assim como em seres humanos as abelhas são susceptíveis a numerosas enfermidades, necessitando de tratamentos adequados à base de fármacos como as sulfonamidas para prevenção e/ou tratamento destas. Na Figura 3 são apresentadas as doenças que mais afetam abelhas e colméias. Dentre as enfermidades que mais as afetam está a cria pútrida.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (*American Foulbrood*), é produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas [40; 41]. O tratamento ocorre pela administração dos antibióticos na água ou através de alimentação artificial contendo a medicação, geralmente administrada, antes da florada [42].

Este tipo de doença quando acontece é capaz de dizimar dezenas de colméias, sendo uma enfermidade muito temida pelos apicultores.

O Brasil tem se destacado no cenário internacional por ter praticamente erradicado esta doença. A grande questão que envolve doenças na apicultura, assim como em outras atividades produtoras de alimentos, é a utilização de fármacos na prevenção ou tratamento destas. As sulfonamidas são compostos que podem ter sua ação prolongada por muito tempo dependendo do tipo de matriz a qual ela está presente [43]. O uso inadequado de fármacos na prevenção ou controle de doenças na colméia pode acarretar danos a qualidade do produto e causar problemas na saúde do consumidor, uma vez que a contaminação do mel com resíduos de sulfonamidas numa colméia mantém-se durante anos.



(a)

(b)

Figura 3 – Doenças mais frequentes nas colméias e nas abelhas:
(a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.
Fonte: Internet: [44]

1.2 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, tendo sido desenvolvidas em 1935, pelo cientista Gerhard Domagk [45]. São compostos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Figura 4). Sua classificação é realizada com base no grau de absorção pelo trato gastrointestinal e através da duração de seu efeito [46].

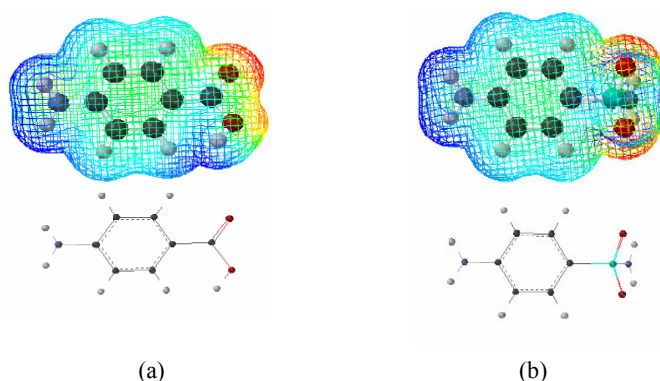


Figura 4 - Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida).
 Fonte: Internet: [47]

Possuem ação bacteriostática e atuam competindo com o ácido *p*-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico, agindo de forma sistêmica, com ação de curta ou longa duração, dependendo do tipo [48].

Os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana das sulfonamidas estão reunidos na própria molécula da sulfanilamida. O grupo – SO₂NH₂ não é essencial em si, mas tem a importante característica do enxofre estar diretamente ligado ao anel benzênico [48].

Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, *pKa*, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica [48].

Quimicamente, as sulfonamidas são ácidos fracos, relativamente insolúveis em água, que apresentam *pKa* variado e são iônicas por natureza [49]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas relevantes das sulfonamidas em estudo nesta pesquisa.

Tabela 2 – Propriedades gerais das sulfonamidas.

Composto	CAS- Number	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)*	Sol. em H ₂ O* (mg /100 mL)	Log K _{ow}	<i>pKa</i>
Sulfadiazina	[68-35-9]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.26	13	0,12 ^b	6,50
Sulfadimetoxina	[122-11-2]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1	1,4 ^a	6,21
Sulfadimidina	[57-68-1]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	272.33	192	0,25 ^a	7,45
Sulfatiazol	[72-14-0]	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.32	1	--	7,24

Fonte: *[50] ; ^a [27]; ^b [51]

A solubilidade das sulfonamidas varia muito em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional. Em meios alcalinos a solubilidade é maior que em pH neutro e ácidos, aumentando em meio ácido de sais sódicos [52].

Em sua molécula as sulfonamidas contêm um grupo amina básico (-NH_2) e um grupo amida ácido (-NH-) que correspondem ao $\text{p}K_{a1}$ e $\text{p}K_{a2}$, respectivamente; apresentando caráter anfótero, ou seja, em soluções básicas o comportamento das sulfonamidas é ácido, devido ao N1 (nitrogênio ácido, que apresenta capacidade de doar prótons), já em soluções ácidas o comportamento das sulfonamidas é básico, devido ao N4 (nitrogênio básico - que apresenta capacidade de captar prótons). A completa ionização é conseguida quando o pH do analito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de $\text{p}K_a$, para compostos ácidos e básicos, respectivamente [53].

Na Figura 5 é apresentado um esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio. Em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

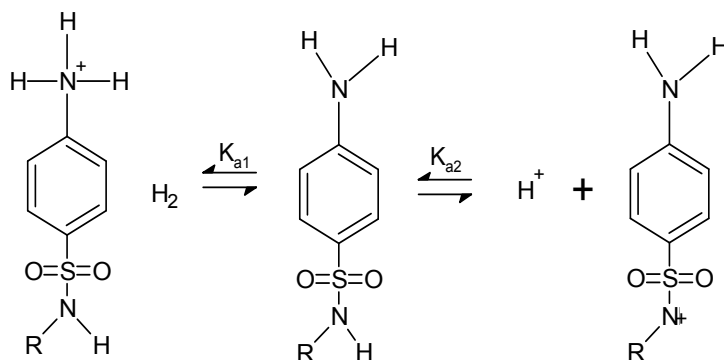
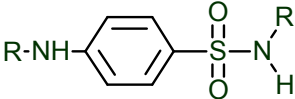
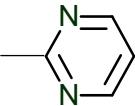
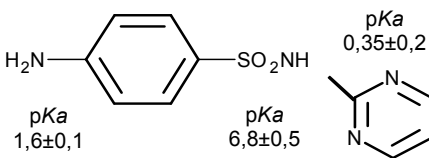
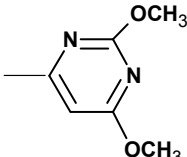
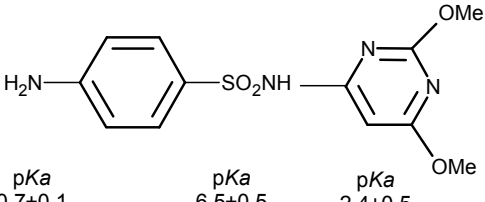
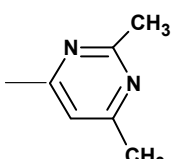
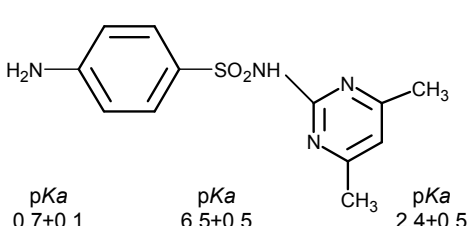
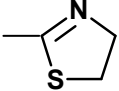
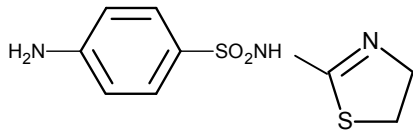


Figura 5 – Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.
Fonte: [53]

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares das sulfonamidas selecionadas para este estudo, bem como as variações dos valores de $\text{p}K_a$ dos respectivos grupos funcionais das sulfonamidas.

Fórmula Geral das Sulfonamidas		
		
Sulfonamida	Radical	Estrutura Completa
Sulfadiazina (SDZ)		 pK_a 1,6±0,1 pK_a 6,8±0,5 pK_a 0,35±0,2
Sulfadimetoxina (SDX)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfadimidina (SDD)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfatiazol (STZ)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5

Quadro 1 – Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo
 Fonte: adaptado de [51], [54] e [23].

1.2.1 Resíduos de sulfonamidas no mel

No que se refere à saúde pública, o monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos vem-se tornando um assunto cada vez mais discutido em nível mundial [51]. Uma grande variedade de fármacos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses,

os das classes: sulfonamidas, betalactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos [55].

Atualmente, grandes volumes de mel são solicitados por mercados internacionais, fazendo com que novas práticas apícolas sejam implantadas a fim de garantir que a produção esteja protegida de possíveis ataques de pragas, doenças ou contaminações [3].

A utilização de fármacos na prevenção e/ou tratamento de doenças na colméia é prática comum entre os apicultores. Resíduos de sulfonamidas podem ocorrer no mel como consequência da utilização destes fármacos no tratamento de doenças de origem bacteriana. A presença de resíduos de sulfonamidas no mel não é desejável, uma vez que o mel é um produto natural e saudável e que, como tal, não deve apresentar substâncias comprovadamente tóxicas.

As exposições de humanos a doses de resíduos de fármacos podem gerar possíveis efeitos prejudiciais à saúde do consumidor. Os efeitos mais comumente encontrados são reações alérgicas, desordens na flora intestinal e possível impacto da resistência de antimicrobianos utilizados em terapia humana. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se, ainda, que aproximadamente 5% dos pacientes humanos tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [56]. Deve-se salientar, entretanto, que ainda não existem evidências científicas demonstrando que esta associação seja decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [57].

1.2.2 Aspectos da legislação

Visando proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores em saúde pública estabeleceram níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) quanto à presença de fármacos em alimentos de origem animal [57]. O LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduo com o qual não ocorra perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) [52].

No Brasil, o Ministério da Saúde é quem estabelece os LMR e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os responsáveis pelas ações fiscais de vigilância do uso de fármacos em alimentos.

Na produção de produtos de origem animal o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do MAPA. O PNCR tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do mel e de outros produtos de origem animal, no território nacional, bem como o aporte dos produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas aos conhecimentos das violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais. Para isto, são colhidas amostras dos alimentos, junto aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) [57].

O LMR de sulfonamidas em mel fixado pelo PNCR é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina (Quadro 01, ANEXO 1).

A ANVISA, recentemente, vem implantando um Programa de Análise de Resíduos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) para diversos tipos de alimentos (leite, carnes, ovos e mel de abelhas), cujo objetivo é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária [58].

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

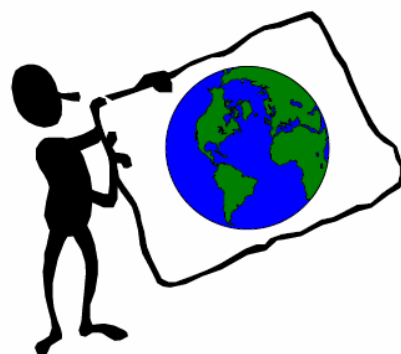
2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para determinar sulfonamidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Comparar diferentes tipos de processos de extração/pré-concentração de sulfonamidas, utilizando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de méis;
- Divulgar a problemática envolvendo a presença de fármacos em alimentos.

3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS



3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que procedimentos de controle de qualidade de alimentos sejam realizados a fim de verificar a presença de resíduos de sulfonamidas e outros contaminantes. O desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença destes resíduos em diferentes matrizes alimentícias tornam-se fundamentais [52]. Segundo Davidson e Branem [59], o monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de medicamentos veterinários tem aumentado devido à importância da repercussão em saúde pública.

A determinação de resíduos de sulfonamidas envolve quantificação de concentrações muito baixas, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. As técnicas analíticas mais comumente usadas para a quantificação destes resíduos são as cromatográficas, associadas a diferentes sistemas de detecção, tais como UV, arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas [52].

A cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos tem sido utilizada com êxito para determinar vários resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal [18]. Embora atualmente muitos métodos confirmatórios como, o CLAE-EM/EM, para a determinação de sulfonamidas em alimentos sejam citados na literatura, estes tipos de determinação requerem o uso de equipamentos caros sendo, portanto, de menor disponibilidade na maioria dos laboratórios de química, principalmente em universidades [60].

A análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento, extração e/ou *clean up* da amostra [49] devido à necessidade de separar, de uma matriz orgânica complexa, compostos em concentrações bastante baixas, de forma a minimizar a presença de interferentes na matriz.

Vários métodos de determinação das sulfonamidas em alimentos estão disponíveis na literatura internacional. Dentre os trabalhos sobre resíduos de sulfonamidas em mel por HPLC pode-se destacar: ZOTOU e VASILIADOU [11]; MAUDENS, ZHANG e LAMBERT [61]; MARTEL e ZEGGANE [62]; PANG *et al.* [63]; HORIE *et al.* [64]; dentre outros.

Zotou e Vasiliadou [11] desenvolveram um método seletivo para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel por SPE-RP-HPLC com detecção UV. A separação das sulfonamidas foi realizada usando coluna C18 (ODS-3), no modo isocrático, e como fase móvel utilizou-se metanol e solução-tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com 1% de ácido acético

(v/v). A detecção UV foi em 263 nm. As amostras de mel foram diluídas em solução-tampão acetato (0,05M) pH 3,6. Utilizou-se cafeína como padrão interno. A extração do resíduo foi realizada usando extração em fase sólida com cartuchos de fase polimérica (Nexus). Recuperações médias dos analitos variaram de 80 a 117%, com limites de detecção de 20 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Maudens, Zhang e Lambert [61] desenvolveram e validaram um método para determinação de doze sulfonamidas (sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina e sulfadoxina) em mel. O pré-tratamento da amostra incluiu uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L⁻¹, seguida por extração líquido-líquido e extração em fase sólida (utilizando cartucho de troca catiônica). A separação foi realizada utilizando-se coluna RP18, no modo gradiente, e com fase móvel constituída de acetonitrila e solução-tampão acetato (0,020 mol L⁻¹) pH 4,75. A detecção foi realizada em comprimento de excitação de 420 nm e comprimento de emissão de 485 nm. O método demonstrou boa exatidão e precisão. O pré-tratamento da amostra aumentou a eficiência do *clean up*. Foram encontradas recuperações médias, nos três níveis, variando de 38,2 a 66,8% e limites de detecção e quantificação de 1 ou 2 e 2 ou 5 ng g⁻¹, respectivamente.

Martel e Zeggane [62] descreveram um método para determinação de sulfatiazol em mel. Foi realizada uma etapa de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. Uma alíquota da amostra hidrolisada utilizando ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ e submetido a uma pré-coluna de derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com detector por fluorescência, usando coluna C18 (Hypersil BDS), no modo isocrático, e com fase móvel composta de acetonitrila e solução de ácido acético 2%. Para a detecção por fluorescência foi aplicado um comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. O limite de quantificação foi de 10 ng g⁻¹. As recuperações variaram de 60,6 a 71,8%. A estimativa do desvio padrão relativo variou na faixa de 0,5 a 2,9%.

Pang *et al.* [63] desenvolveram um método para a determinação de oito sulfonamidas (sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido fosfórico (pH 2). As amostras foram filtradas e em seguida procedeu-se à extração em fase sólida utilizando-se dois cartuchos um de troca catiônica e outro OASIS HLB. Procedeu-se à derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada por cromatografia líquida por detecção por fluorescência, usando coluna RP 18, no modo

isocrático, e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e solução de dihidrogeno-fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹. A detecção foi realizada com comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. Recuperações médias nos três níveis de fortificação variaram de 73,5 a 94,1% e coeficientes de variação de 4,35 a 16,60%. O limite de detecção foi de 0,002 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina, e 0,005 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacoloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina. O limite de quantificação foi de 0,005 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina e 0,010 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacoloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

Horie, Satto e Nose [64] desenvolveram um método usando cromatografia líquida por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) para a determinação simultânea de dez sulfonamidas (sulfatiazol, sulfacoloropiridazina e sulfaquinoxalina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 30% e, então, extraídas com diclorometano. Os extratos foram percolados em cartucho de Florisil para realizar um *clean up* na amostra. A separação cromatográfica foi realizada em coluna RP-18 (Lichosphere), como fase móvel utilizou-se solução de dihidrogeno fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹) e acetonitrila. A detecção foi a 275 nm. As recuperações no nível de 0,05 µg g⁻¹ foram de 62,1 a 90,2% e os limites de detecção foram 0,05 µg g⁻¹ para cada composto.

Na Tabela 3 são apresentados métodos cromatográficos assim como os métodos de extração reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em mel e em outras matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
HAMMEL <i>et al.</i> [22]	Mel	SDZ,SMR,STZ,SPD, SAD,SMZ,TAP,SME, DAP,SID,SMTX,SDM, STR,DHS,CAP,SBM, OTC,AMP,TC,SDX, SQX,DMC,CTC,NEO, PENG,SPI,DC,PEN, DES,OLE,TIL,TYL, OXA,EA,CLOX,NAF, DIC,ROXI,AMOX,SCP	HPLC-ESI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 26-61% e Limites de detecção de 31,3-49,0 µg/kg
WANG <i>et al.</i> [65]	Mel e frango	SMT, SMR e SDZ	HPLC-DAD Imunoensaio com polarização fluorescente	Foram encontradas recuperações de 86-131%. Limites de detecção de 0.9 ng g ⁻¹ 3.1 ng g ⁻¹ .
TAMOSUNAS e PADARAUSKAS [66]	Mel e ovos	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPLC-MS/MS UPLC-MS/MS LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 80-110%. Limites de decisão de 6.61-9.43 µg kg ⁻¹ and 7.25-11.9 µg kg ⁻¹ para UPLC e LC, respectivamente.
GRANJA <i>et al.</i> , [67]	Mel	STZ, SMZ E SDM	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 61.0% a 94.5%. Limites de detecção de 3 µg kg ⁻¹ , 4 µg kg ⁻¹ and 5 µg kg ⁻¹ respectivamente
ZOU <i>et al.</i> , [68]	Mel	STZ, SPD, SDZ, SMR, SMMX, SCP, SMX, SDM	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações > 70%. Limites de detecção 4 µg kg ⁻¹ .
MOHAMED <i>et al.</i> [24]	Mel	SAD,DAP,SPD,SDZ, SMTX,STZ,SMR,SMX, SMP,SME,SCP,SQX, SDX,SDT,SSZ	HPLC-APPI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,4% e Limites de quantificação de 10 µg/Kg
KOESUKWIWAT <i>et al.</i> [23]	Leite	SDZ,STZ,SMZ,SMP, SMX,SDM,CTC,TC OTC,PYR	HPLC-ESI-MS SPE	Foram encontradas recuperações de 5-166% (nos vários níveis)
SUN <i>et al.</i> [9]	Envoltório para salsicha (tripa de origem animal)	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMDZ,SMT,SMMX, SMP,SIA,SMX,SDM, SQX	HPHPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 65,2-85,9%. Limites de detecção de 0,3-0,4µg/kg e limites de quantificação de 1,5-2,2 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
LU <i>et al.</i> [25]	Carne (suína)	SDZ,STZ,SMR,SMT, SMMX,SMXZ,SQX, SDMX	HPLC-ESI-MS HPLC-APCI-MS SPME	Limites de detecção de 16-39 µg/Kg e limite de quantificação de 53-130 µg/Kg
KISHIDA [26]	Carne (bovina, aves, suína)	SDD,SDZ,SMM,SMX, SDM,SQX	HPLC-MS MSPD	Foram encontradas recuperações de 90,5-97,6% e Limites de quantificação de 0,006-0,04 µg/g
GARCÍA <i>et al.</i> [17]	Visceras de animais (rim)	SDZ,SMT,SMP,SMX SDM,SQX	HPLC-DAD LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 46-63%. Limites de decisão de 3,48-3,84 µg/Kg e Capacidade de detecção de 109,8-161,7 µg/Kg
BISWAS <i>et al.</i> [69]	Carne (búfalo)	TMP,SDD,SDX,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 75-108%. Limite de detecção de 0,031µg/g e limite de quantificação de 0,062 µg/g
FELTRIN <i>et al.</i> [10]	Leite	SDX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 76-90% e limite de detecção de 4,59µg/L e limite de quantificação de 13,9 µg/L
ZOTOU e VASILADOU. [11]	Mel	SCT,STZ,SPD,SMR SMP,SMX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 80-117% e Limites de detecção de 20-25µg/Kg
WANG <i>et al.</i> [49]	Produtos de origem animal	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPHPLC,HPCE, THPLC,ELISA, IMUNOENSAIOS LLE,SPME,SPE	Vários artigos sobre sulfonamidas em alimentos de origem animal
GALLINA <i>et al.</i> [12]	Mel	Streptomycina, Tylosin, SAD,SDZ,STZ,SMZ, SDX,SMTX,SDM	HPLC-FL LLE	Foram encontradas recuperações de 11,5-96,5%. Limites de detecção de 1,7-22ng/mL e limites de quantificação de 5,5-75 ng/mL
PECORELLI <i>et al.</i> [70]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SMMX,SCP,SMX SQX,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 62,4-85,1% e Limite de decisão 105,3-109,5 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
KISHIDA e FURUSAWA [19]	Carne (aves) e ovos	SMM,SDM,HIDRÓXI/N ⁴ -ACETIL	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 90-97% e limites de detecção de 7,2-29,8 ng/mL
LAMBA <i>et al.</i> [71]	Leite	SAD,SGN,SDZ,STZ, SMTX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 85-114%. Limites de detecção de 1,59-7,68 nmol/L e limites de quantificação de 5,3-25,59 nmol/L
PANG <i>et al.</i> , [72]	Mel	STZ, SCT, SAI, SMM, SDX,SDZ, SPD, SCP, SMTX, SMR, SMP, SDM, SMZ, SME	HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70.9-102.5%. Limites de quantificação de 1.0 and 12.0 µg/kg
POSYNIK <i>et al.</i> [73]	Carne (frango)	SDZ,SMZ,SMX,SMR, SDM,SMP	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações de 90-95%. Limites de detecção 1 ou 5 µg/Kg CCα: 103,8-127,6 µg/Kg CCβ: 115,0-137,4 µg/Kg
MAUDENS <i>et al.</i> [61]	Mel	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SME, SMT,SMP,SCP,SDX	HPLC-FL LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 37,4-66,8%. Limites de detecção de 1-2 ng/g e limites de quantificação de 2-5ng/g
PECORELLI <i>et al.</i> [18]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SQX,SDM,SCP, SMM,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 51-109% CCα: 105,2-116,2 µg/Kg CCβ: 110,9-134,9 µg/Kg
GENTILI <i>et al.</i> [60]	Carne e alimentos infantis	SID,SDZ,SPD,SMR, SMO,SMZ,SMT,SMP, SMM,SCP,SMX,SQX, SDM	HPLC-MS/MS	Foram encontradas recuperações de 70-101%. Limite de detecção de 2,6 ppb e limites de quantificação de 1,2-7,8 ppb
ZAYAS-BLANCO <i>et al.</i> [13]	Leite	SMZ	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 82,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 3µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
POSYNIAK <i>et al.</i> [74]	Mel	SCT,STZ,SMZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80%. Limites de detecção de 0,1µg/Kg e limites de quantificação de 0,2 µg/Kg
PANG <i>et al.</i> [63]	Mel	SCT,SPD,SMR,SMP, SME,SCP,SMX,SDM	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 73,5-94,1%. Limites de detecção de 0,005mg/Kg e limites de quantificação de 0,002 mg/Kg
REYBROECK [75]	Mel	Streptomycin, Tetracyclines, Cloranfenicols, SMZ, STZ,SCT	HPLC-UV	Limites de detecção para as sulfas de 25-50µg/Kg e limite de quantificação para as sulfas de 20µg/Kg
MARTEL e ZEGGANE [62]	Mel	STZ, SMZ	HPLC-FL IMUNOENSAIO DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 2µg/Kg
FURUSAWA [21]	Leite	OTC,SDD	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 88,8-93,1%. Limites de quantificação 0,044 µg/mL (OTC) e 0,023 µg/mL(SDD)
POSYNIAK <i>et al.</i> [76]	Mel	SCT,SMT,STZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80,9-83,4%. Limite de detecção de 0,1-0,5µg/Kg
HELLER <i>et al.</i> [77]	Ovos	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SMZ, SMT,S P,SCP,SMX, SMMX,SIA,SDM,SQX	HPLC-MS-MS HPLC-UV LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 51-103%
FURUSAWA [14]	Leite	SMZ,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 81-94%. Limites de detecção de 5-10ng/mL e limites de quantificação de 3-5ng/mL

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
STOEV e MICHAILOVA [78]	Produtos de origem animal	SAD,SDZ,SMR,SDD, SMP,SOX,SMX,SDM, SQX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 64-75% e Limites de detecção de 0,5-1,0 µg/g
ITO <i>et al.</i> [79]	Visceras de animais (rins e fígado)	SDZ,SMR,SDD,SMP, SAI,SMMX,SMTX, SDM,SQX	HPLC-UV HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70,8-98,2% e Limites de detecção de 0,03 µg/g
FURUSAWA [80]	Leite	SMZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações maiores que 83% e Limites de detecção de 4 µg/kg
HEERING <i>et al.</i> [81]	Mel	TC, Streptomycin, STZ	Imunoensaio - EIA	Foram encontradas recuperações de 100-105%. Limites de detecção de 50 µg/g
GEHRING <i>et al.</i> [82]	Salmão	SDZ	HPLC-API/MS	Foram encontradas recuperações de 59,2-78,3%. Limite de detecção de 0,2 ng/g e limite de quantificação de 1,0 ng/g
CANNAVAN <i>et al.</i> [83]	Carne	SMT	CG-MS SPE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 86-114% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
VIÑAS <i>et al.</i> [84]	Leite	SA,SGN,SDZ,SPD,SMX	HPLC-FL LLE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 82-104% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
HORIE <i>et al.</i> [64]	Mel	STZ,SDZ,SMR,SMP, SDD,SMMX,SCP, SMX,SQX,SDM	HPLC-DAD SEM EXTRAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 62,1-90,2%. Limites de detecção de 0,8µg/g
AGARWAL [15]	Leite	SDZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 83-88%
PATHY [85]	Carne	SQX	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 77-85%

3.1 PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise de quantidades muito pequenas (traços) de contaminantes em matrizes complexas como alimentos frequentemente requerem inúmeras etapas de preparação e extração de amostras antes das técnicas de análises instrumentais (detecção e quantificação). Dentre as várias etapas envolvidas na preparação de amostras, alguns passos são mais comuns, tais como amostragem (homogeneização), extração, *clean-up* (eliminação de interferentes), separação e concentração, detecção e quantificação dos analitos [86].

Técnicas, como a cromatografia a líquido, requerem uma etapa de preparo da amostra antes da análise, de forma a minimizar erros na análise e evitar danos nas colunas cromatográficas [87].

Atualmente existem vários métodos para o preparo de amostras, com inúmeras possibilidades, vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método quando se trabalha com matrizes complexas, como alimentos, exigem que o analista tenha o conhecimento tanto da matriz com a qual se está trabalhando assim como da técnica instrumental que será utilizada posteriormente para a detecção/quantificação do composto, a fim de evitar, principalmente, que interferentes possam ser co-eluídos juntamente com os analitos de interesse e efeitos de matriz sejam incluídos nos resultados [88].

Segundo Queiroz, Collins e Jardim [89], as técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo do analista gasto durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras em determinado tempo.

Dentre as técnicas de extração mais comumente utilizadas para concentrar analitos em mel pode-se destacar a extração em fase sólida (EFS) [11; 63; 72; 73 e 74], extração líquido-líquido (LLE) seguida de EFS [61], e extração líquido-líquido [12 e 22].

3.1.1 Extração por Fase Sólida (EFS)

A extração por fase sólida é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [88]. O método de extração por fase sólida foi desenvolvido na década de 70, visando resolver algumas desvantagens da extração líquido-líquido e otimizar rotinas [90].

É uma técnica que consiste na separação líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica, através da qual a solubilidade de interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição [88; 91]. Através de forças intermoleculares, do tipo das de Van der Waals ou dipolo-dipolo, entre o analito e a superfície adsorvente da fase sólida ocorre o mecanismo de retenção e eluição dos analitos. Dependendo do grau de afinidade do analito com o solvente de eluição, este terá maior ou menor retenção [88].

A extração por fase sólida tem vários objetivos [87], sendo eles:

- (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;
- (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes;
- (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito; e
- (d) estocagem da amostra, muito usada para evitar o transporte de grandes volumes das mesmas.

Existem dois tipos de sistemas de extração por fase sólida: em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema em linha, a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. No sistema fora de linha (*off-line*), a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor [91]. Nesta pesquisa, utilizou-se o método de extração em fase sólido com sistema off-line.

Na prática, para uma extração por fase sólida são utilizados tubos de polipropileno no formato de seringa, contendo a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia), usualmente denominada cartucho de extração [88], conforme mostrado na Figura 6.

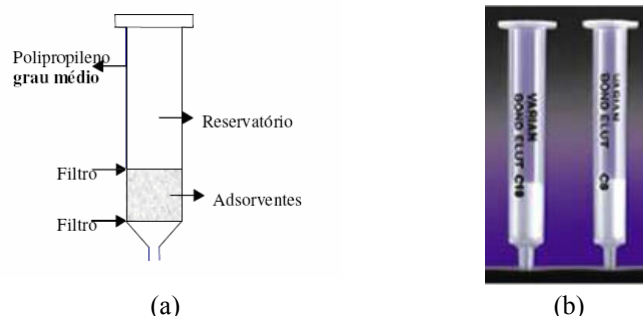


Figura 6 – (a) Esquema de cartucho para extração EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.
Fonte: (a) [88]

O atual estágio de desenvolvimento da extração em fase sólida deve-se em grande parte às descobertas de novos adsorventes [89]. No Quadro 2 são apresentados os principais tipos de adsorventes utilizados em extração em fase sólida.

Quadro 2 - Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.

Não-polares	Polares	Troca Iônica
Octadecilsilano – C18	Florisil – FL	Benzenossulfonilpropilsilano – SCX
Octilsilano – C8	Alumina – Al	Sulfonilpropilsilano – PRS
Etilsilano – C2	Sílica – Si	Carboximetilsilano – CBA
Metilsilano – C1	Cianopropilsilano – CN	Dietilaminopropilsilano – DEA
Fenilsilano – PH	Diolsilano – 2OH	Trimetilaminopropilsilano – SAX
Cicloexilsilano – CH	Aminopropilsilano – NH ₂	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA
	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA	
	Poliméricas (Nexus)	

Fonte: adaptada de [91]

Recentemente, alguns estudos visando desenvolver fases de EFS com aplicações mais específicas têm sido desenvolvidos. As fases poliméricas são exemplos típicos destas fases, as quais possuem maior capacidade de retenção que as de sílica, tendo seletividade usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel [93].

Na Figura 7 é apresentado um esquema do procedimento de extração em fase sólida. Na etapa A, ocorre a ativação e condicionamento do cartucho; na etapa B, ocorre a aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; na etapa C, ocorre a troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*) e, por último, na etapa D ocorre a troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

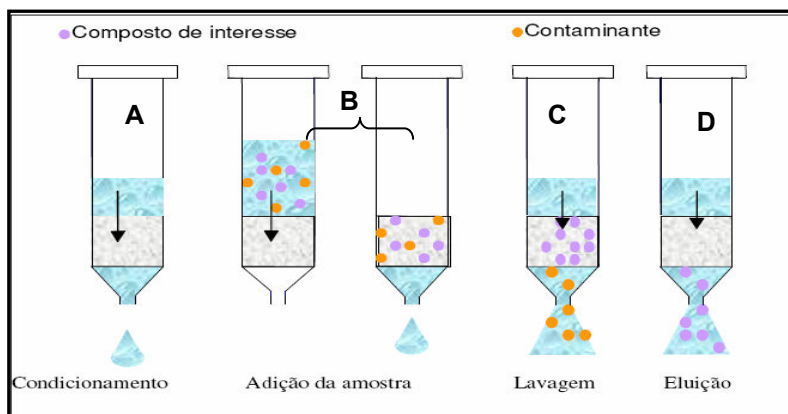
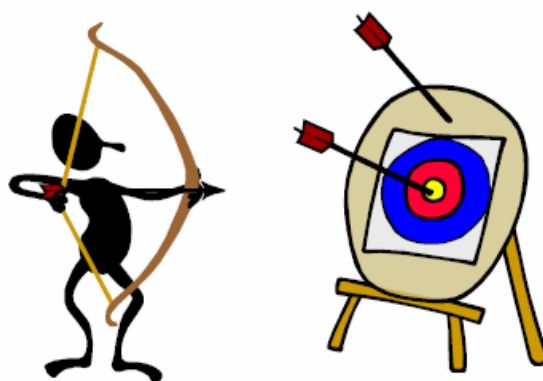


Figura 7 - Principais etapas empregadas em extração por fase sólida (EFS).

Fonte: [87]

Na prática, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com um pequeno vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Após a drenagem de toda a fase líquida, os analitos de interesse ficarão retidos na fase sólida do cartucho. O analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito pré-concentrado, ou seja, com a concentração apropriada para a análise [88].

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO



4.VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nenhuma análise química, automatizada ou manual, fornece resultados isentos de erro. Geralmente, os resultados são reportados em forma de valores numéricos que contêm informações que devem ser corretamente interpretadas e avaliadas, de acordo com as especificações do método e as necessidades de cada usuário do mesmo resultado [93]. Neste contexto, dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico, ou mesmo a adaptação de um método já existente, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [94].

Segundo o INMETRO [95], a validação de um método de ensaio é a denominação que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida. O processo de validação de métodos analíticos desenvolvidos em laboratórios é efetuado após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos. Para Barros [96] a validação do método analítico permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [97] e que envolve várias etapas. A NBR/ISO IEC 17025 [98] define que um processo de validação deve incluir a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método. Todo processo de validação deve ser abrangente o suficiente, de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos [97].

Existem vários órgãos internacionais responsáveis por processos de validação, que estabelecem muitos conceitos e procedimentos sobre este processo, gerando um grande volume de informações. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os responsáveis por processos de validação. Estes órgãos disponibilizam guias, diretrizes ou mesmo normas, para o procedimento de validação de métodos analíticos.

No Quadro 3 são apresentados os principais critérios utilizados para a validação de métodos segundo os mais reconhecidos órgãos de regulamentação, nacionais e internacionais.

Quadro 3 - Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO	ICH	USP	IUPAC
Especificidade/Seletividade	x	x	x	x	x ¹
Faixa de trabalho e Faixa linear	x	x	x	x	x
Linearidade	x	x	x	x	x ¹
Limite de Detecção	x	x	x	x	x
Limite de Quantificação	x	x	x	x	x
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	-	-	-	x
Exatidão e tendência	x ¹	x	x ¹	x ¹	x
Precisão (repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade)	x ²	x	x ¹	x ¹	x
Robustez	x	x	x	x	x
Incerteza de medição	-	x	-	-	x

¹- Realiza calibração; ²- Não realiza tendência

Os principais parâmetros utilizados para a validação de métodos cromatográficos são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez [97]. A Figura 8 mostra um fluxograma com as etapas do procedimento analítico para a validação do método para análise de resíduos de sulfonamidas em mel proposto neste trabalho.

4.1 FAIXA DE APLICAÇÃO

A faixa de aplicação de um método refere-se ao intervalo entre a concentração superior e inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade [99].

Na prática a faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, e é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão [99].

Segundo Thompson *et al.* [100], a IUPAC estabelece duas faixas de aplicação, uma para impurezas (0-150%) e outra para macro-componentes (50-150%), sendo que o valor esperado deve estar contido dentro de uma destas duas faixas. A AOAC [101] recomenda que, para análise de traços, a faixa seja compreendida entre o limite de quantificação e duas ou três vezes o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Na análise de fármacos, a ANVISA indica uma faixa de aplicação entre 80-120% da concentração teórica do analito, e recomenda que seja determinado intervalo linear de, no mínimo, 5 níveis de concentração diferentes [102].

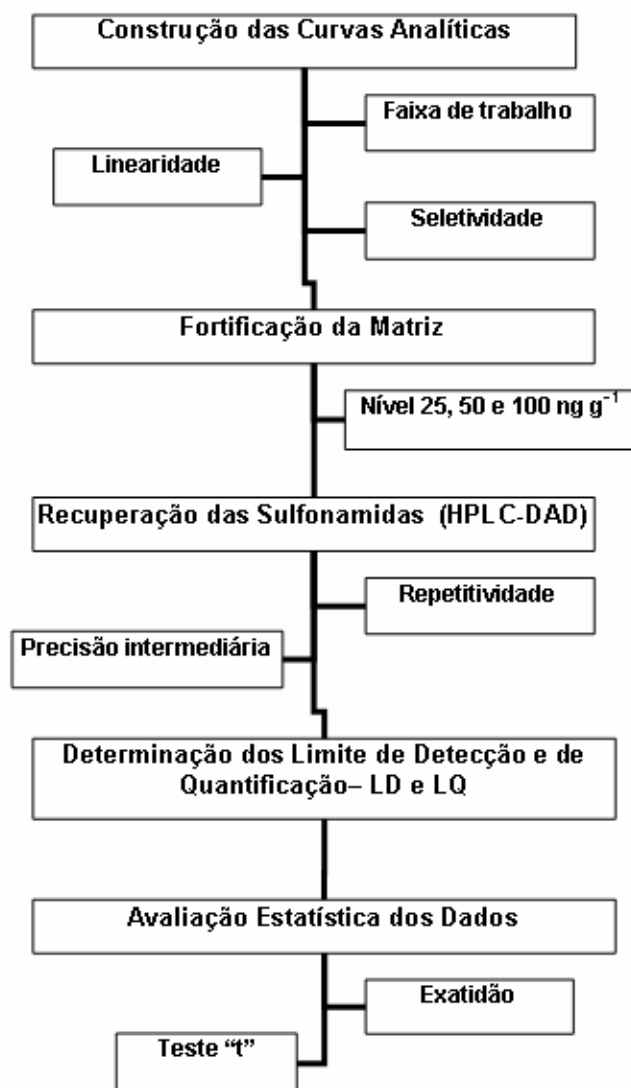


Figura 8 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação [97].

A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico [103]. Na maior parte das vezes uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito deve ser determinada empiricamente e pode ser representada como uma equação de reta, geralmente chamada de curva analítica ou gráfica de calibração, que representa a resposta de um método analítico como função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido [104].

Segundo Hubert *et al.* [105] uma outra forma de se avaliar a linearidade é por meio da relação entre concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear.

Em geral recomenda-se que o coeficiente de correlação seja maior que 0,990, sendo considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a regressão [95]. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [97].

4.3 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método analítico determinar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz [103]. A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da matriz, tais como, impurezas, ingredientes ativos, excipientes, e outros compostos de formas similares que possam estar presentes [106].

A seletividade é um parâmetro muito importante quando se trabalha com análises de multiresíduos. Deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, não sendo um parâmetro a ser realizado uma única vez, e sua realização deve ocorrer de forma contínua. Conhecer os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a análise ajuda na escolha das melhores condições para detecção. É através da seletividade que se garante que o pico cromatográfico seja o do composto em estudo [97].

4.4 PRECISÃO

A precisão refere-se à proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas [99]. Pode ser expressa pelo desvio dos resultados em relação à sua média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV) [97], conforme apresentado na equação 1.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{X}$ = média das recuperações.

Em análises de traços são aceitos valores de RSD de até 20%, já para métodos que quantificam compostos em macro-quantidades, o RSD deve ser de 1 a 2%. A precisão também pode ser melhorada através de um maior número de replicatas [107].

Comumente, a precisão de um método analítico em validação de métodos pode ser expressa como repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade [100].

4.4.1 Repetitividade

A repetitividade (ou repetibilidade) refere-se à precisão entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições, equipamentos, analistas, em um curto intervalo de tempo [99]. O INMETRO [95] recomenda sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r').

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo a mais aconselhável de ser adotada. Tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente os resultados não tenham diferença [99; 97]. O número de ensaios para a precisão intermediária segue a mesma recomendação que para a repetitividade segundo INMETRO [95].

4.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, ou seja, em localidades diferentes, utilizando um mesmo conjunto de amostras [103]. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratoriais), e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em legislações, ou farmacopéias etc... [97].

4.5 EXATIDÃO

A exatidão é estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [103]. Sempre se considera a exatidão dentro de certos limites, a um dado nível de confiança [97]. Para a ANVISA [58] e o ICH [99] é necessário um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração.

Os procedimentos mais recomendados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do analito. Para a análise de matrizes biológicas, como alimentos, os ensaios de recuperação são os mais utilizados [97; 103].

4.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação pode ser definido como a quantidade de analito presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada [100]. A recuperação está relacionada com a exatidão, porque reflete a quantidade de determinada substância recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra [103].

Na prática, o estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, também sendo denominada de fortificação. A equação 2 apresenta a relação utilizada para os cálculos da percentagem de recuperação.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

Na Figura 9 é mostrado o esquema proposto por Brito [108] para representar o processo de fortificação.

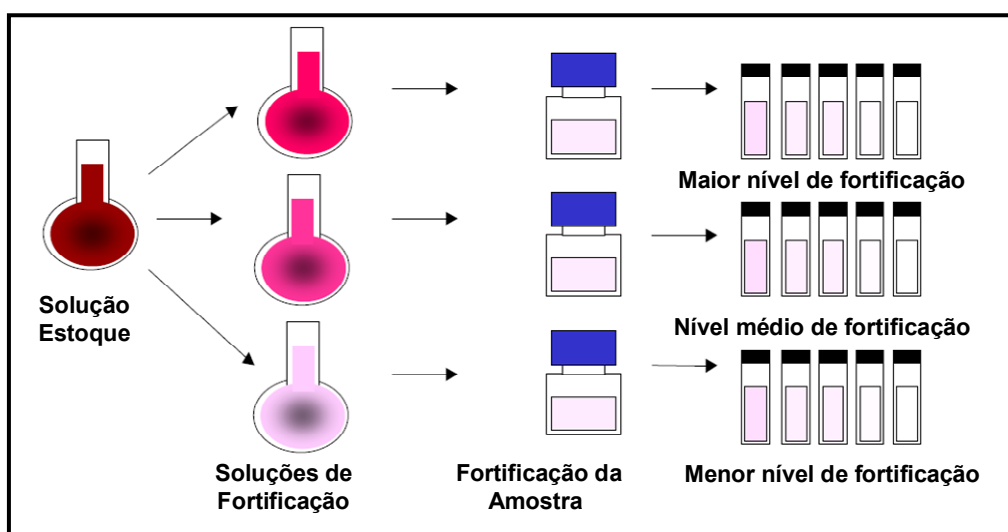


Figura 9 - Processo de fortificação das amostras.
Fonte: [108]

A limitação do procedimento de recuperação baseia-se no fato de que a substância adicionada não se apresenta na mesma forma que a encontrada originalmente na amostra, devendo-se ter o cuidado de reproduzir ao máximo as condições originais da amostra. Outro fator limitante para os ensaios de recuperação é o efeito da matriz, uma vez que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, sendo necessário investigar e eliminar estes efeitos dos interferentes [104].

Para garantir que os resultados sejam confiáveis é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, devendo-se avaliá-la na faixa de concentração esperada do composto de interesse [97].

Segundo a Comunidade Européia [109] os intervalos aceitáveis para recuperação em análises de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Contudo, em função da complexidade da composição da amostra esta faixa de variação pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 35\%$.

No estudo de recuperação também são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de *Student* de acordo com a equação 3. Se o valor “t” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato.

$$t_{calc} = \frac{(Rec - 100)}{s_{rec} / \sqrt{(n-1)}} \quad (3)$$

Onde: Rec é a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 é a recuperação percentual desejada; n é o número de determinações (em geral, um mínimo de 5 repetições); s_{rec} é o desvio padrão nas recuperações.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual para a determinação do limite de detecção, pelo método da relação sinal/ruído e por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica [97].

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração detectável em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas; S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*).

4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas [97]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [103].

A determinação do valor do limite de quantificação do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a validação dos resultados, tornando o método menos preciso [110]. Concentrações maiores para o limite de quantificação deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão [96].

O limite de quantificação também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o limite de detecção, sendo que para o limite de quantificação a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e, a equação utilizada é demonstrada na equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

5. MATERIAIS E MÉTODO



5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do método para a determinação de sulfonamidas em amostras de mel cinco etapas foram planejadas. A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a revisão bibliográfica sobre a ocorrência de sulfonamidas em alimentos e mel de forma a reunir dados científicos e literatura para oferecer suporte no desenvolvimento do método. A segunda etapa consistiu no estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas para a análise quantitativa. Uma vez otimizados os parâmetros cromatográficos estes foram fixados e em seguida foram obtidas curvas analíticas dos compostos. Na terceira etapa foi feito um estudo de pré-tratamento da amostra utilizando hidrólise ácida e também foram estabelecidas e otimizadas as condições de extração em fase sólida. As amostras usadas nesta etapa foram às coletadas na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA. Na quarta etapa procedeu-se à validação do método proposto. A última etapa foi realizada pela aplicação do método, utilizando-se amostras de méis comerciais coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins.

5.1.1 Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas

As amostras de mel foram coletadas no apiário Turimel, localizado na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA que está localizada na região do Alto Turu, no estado do Maranhão, às margens da BR 316. A área total do município é de 904, 95 km², localizando-se próximo à fronteira do Estado do Pará, a 420 quilômetros da capital do Maranhão, São Luís.

Segundo apicultores do local a flora comumente visitada pelas abelhas da região inclui as seguintes plantas (nomes populares): chanana, assa-peixe, vassourinha de botão, hortelãzinho, bamburral, juçara, embaúba, maria-mole, cajueiro, laranjeira e seringueira.



Figura 10 – Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.

Fonte: adaptado de [111]

A coleta das amostras para o desenvolvimento do método foi realizada no mês de setembro de 2007. O critério estabelecido para a coleta das amostras a serem utilizadas para o desenvolvimento do método foi a ausência de resíduos de fármacos e outros resíduos de contaminantes. Optou-se por fazer a coleta neste apiário após análise do histórico produtivo do apiário, onde se evidenciou a preocupação com a qualidade do produto. O apiário, atualmente, está buscando certificação orgânica, fato este que serve como indício de que o mel produzido neste apiário seja livre de resíduos de contaminantes.

Foram coletados 30 kg de mel e estes foram armazenadas em frascos de vidro envoltos por papel alumínio a fim de evitar degradação de alguns compostos por ação da luz. Outro cuidado tomado com as amostras foi manter uma vedação dos frascos eficiente, visando impedir a entrada de ar e início de possíveis processos fermentativos. As amostras foram conservadas a temperatura ambiente.

Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para o início das atividades de pesquisa.



Figura 11 - (a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.

5.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram:

5.2.1 Padrões

- Sulfadiazina (SDZ) – Sigma Aldrich, com pureza de $\geq 99\%$;
- Sulfadimetoxina (SDM) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfadimidina (SDD) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfatiazol (STZ) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% .

5.2.2 Reagentes e Solventes

- Metanol (HPLC solvent Merck-Germany);
- Acetonitrila (HPLC solvent Merck-Germany);
- Água ultra pura (Milli-Q), sistema Millipore;
- Acetato de Sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) M.M. 136,09 - Merck-Germany ;
- Ácido Acético Glacial P.A. (CH_3COOH)- M.M 60,05 - Merck-Germany.

5.2.3 Dispositivos para Extração por Fase Sólida

- Octadecil silano (C_{18}): cartucho - C_{18} – 500 mg/6mL – AccuBON^{II}ODS – Agilent Technologies;

- Octil silano (C₈): cartucho - Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- Cartucho: ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian.

5.2.4 Coluna Cromatográfica

- Coluna cromatográfica analítica - Phenomenex – 150mm x 4,0 µm d.i, recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica.
- Coluna de Guarda para coluna C-18 – Phenomenex, KJ0-4282.
- Coluna cromatográfica analítica C₈ - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb-Varian.

5.2.5 Equipamentos

- Balança eletrônica, modelo Bel Mark 210A, faixa de pesagem de 10mg-210g – Bell Engineering, Italy;
- Banho ultra-som USC 1450 – Unique Thorton, Brasil;
- Bomba de vácuo – Marconi, modelo MA058, Brasil;
- Cromatógrafo a Líquido marca Varian (EUA), composto por:
 - Bombas de alta pressão - binária - Varian Polaris ProStar 210/210;
 - Injetor manual, loop 20µL - Rheodyne;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, Varian Polaris ProStar 335 – Varian (EUA);
 - Computador Digital, Intel Core 2, 2,4 GHz, HD 160 Gb, com impressora HP Deskjet D 4160;
- Deionizador de água – Milli-Q Academic System – A10, sistema Millipore (EUA);
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian (EUA);
- Rotaevaporador – Fisatom – Brasil, modelo 802;
- pHmetro Hanna Instruments, com eletrodo de pH HI 1110B (vidro combinado) modelo pH 21, Brasil;

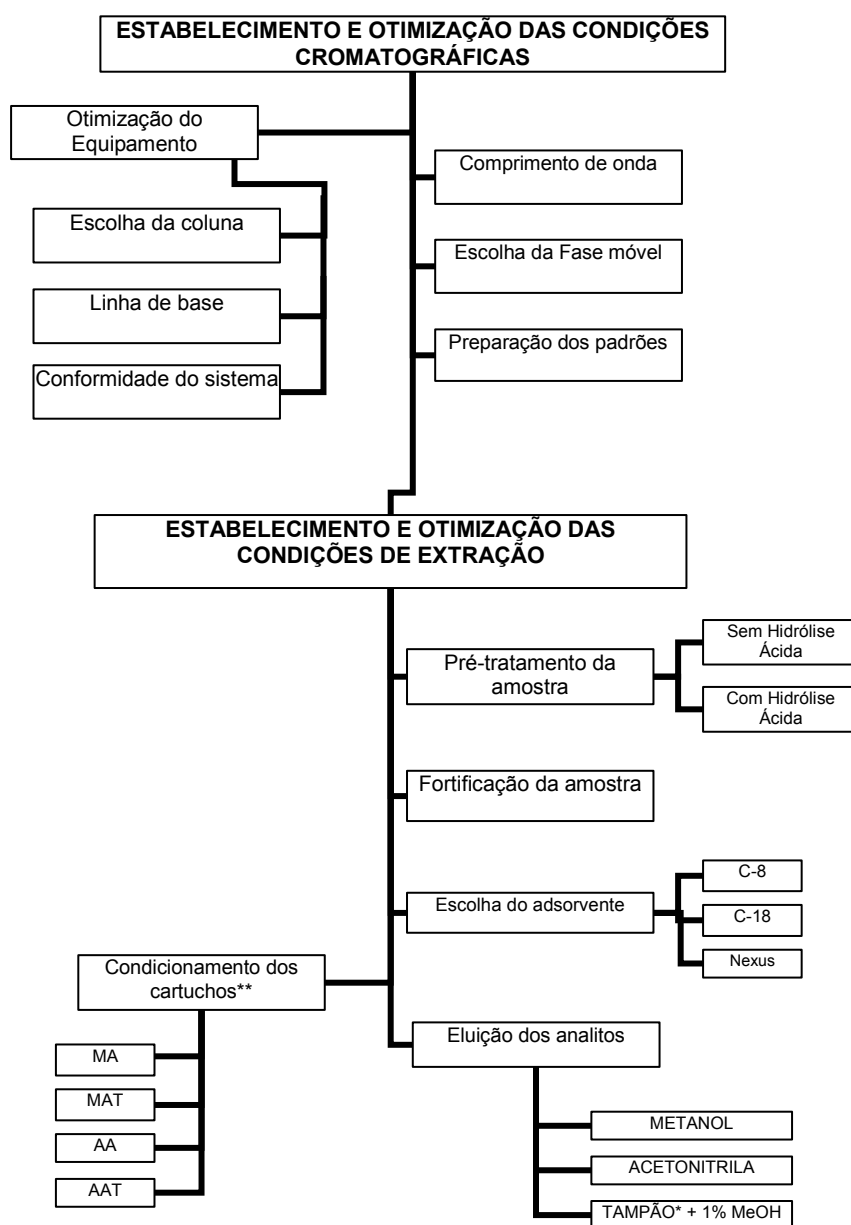
5.2.6 Outros materiais

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0 e 1000,0 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 10 e 100 mL;
- Espátula de aço inox;
- Membrana Acetato de celulose, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - SartoriusMerck;
- Membrana de Vidro, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - Merck
- Detergente Extran – Merck;
- Outros materiais de laboratório (Becker, proveta, micro pipetadores (100-1000 µL e 10-100 µL), funil de separação, pipeta, pipeta de *Pasteur*);
- Sistema de extração a vácuo (*manifold*), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (EUA).
- Gás nitrogênio (N₂) – *White Martins* (Brasil);

5.3 MÉTODO

Os métodos de análises de resíduos de sulfonamidas são desenvolvidos para atender as análises de analitos individuais e análise simultânea de vários resíduos, denominadas “análise multiresíduo”. O desenvolvimento de métodos multiresiduais, em geral, são muito trabalhosos, uma vez que são determinados analitos com características diferentes sofrendo também interferência dos constituintes da matriz que normalmente interferem na análise.

A Figura 12 mostra um fluxograma com a visão geral das etapas do procedimento analítico para o estabelecimento das condições cromatográficas e condições para as extrações.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

** MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.

Figura 12 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.

5.3.1 Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas

A primeira etapa para o estabelecimento das condições cromatográficas consistiu na otimização do equipamento, onde foram realizados os experimentos para escolha da coluna, linha de base e conformidade do sistema (de acordo com os critérios citados por SHABIR,

[113]). O estudo das condições cromatográficas compreendeu seleção do comprimento de onda, escolha da composição da fase móvel e solvente para preparação das soluções-padrão.

5.3.1.1 Seleção da coluna

Para a análise das sulfonamidas foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octilsilano C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb -Varian) e a outra contendo uma fase estacionária octadecilsilano C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm - Phenomenex).

5.3.1.2 Linha de Base do Solvente

É o sinal obtido pelo sistema cromatográfico detector DAD, mais a coluna utilizada com a injeção do solvente. O sinal da linha de base foi obtido injetando-se 20 µL de metanol, um dos solventes a ser utilizado nos procedimentos de desenvolvimento e validação do método. Este teste também forneceu informações sobre o grau de pureza do mesmo, que deve ser grau resíduo (CLAE), necessário para análise de traços de fármacos, com um mínimo de impurezas possível.

5.3.1.3 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada na etapa de otimização do equipamento, assim como no desenvolvimento e validação do método. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção (k'), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critérios de aceitação foram utilizados os parâmetros recomendados por Shabir [113], conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Limites
Fator de retenção (k')	$1 < k' < 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$
Número de pratos teóricos da coluna sendo usada (N)	$N/m > 8000$

Fonte: adaptado de [113].

5.3.1.4 Seleção do Comprimento de onda

Foram realizados dois testes para obtenção dos espectros de absorção, um utilizando espectrofotômetro modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) e outro usando o próprio detector do cromatógrafo (ProStar 335 - Varian). Os espectros de absorção obtidos no espectrofotômetro corresponderam a uma varredura de 190 a 300 nm e a varredura feita no detector do cromatógrafo correspondeu a 250 a 280 nm. O comprimento de onda correspondente à absorbância média dos analitos foi posteriormente utilizado para a determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos.

5.3.1.5 Seleção da fase móvel

Para a análise cromatográfica (CLAE) dos analitos foram testados seis tipos de fases móveis, no modo gradiente.

O preparo dos solventes para a fase móvel consistiu na filtração em kit para filtração com membrana de porosidade 0,45 µm para solventes, orgânicos e água, e desgaseificação em banho ultra-som por 20 minutos para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em garrafas próprias para solventes e foram rotuladas com informações a respeito da sua composição e o valor do pH. Antes do início dos trabalhos as soluções permaneceram no banho ultra-som por 10 minutos para a retirada de gases dissolvidos.

5.3.1.6 Preparação dos padrões

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas, individualmente, pela dissolução dos padrões em metanol. Pesou-se em balança analítica 0,0010g da sulfonamida e solubilizou-se cada uma em metanol, completando-se o balão para 0,01 L de solução. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar rotulado e com tampa de rosca para ser estocado. As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4°C, para evitar degradação dos padrões.

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o teste a ser realizado. Foram utilizados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho: solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 4,5 e solução aquosa de ácido acético 0,1%. As soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações e usadas para fortificação das amostras e para preparo das soluções padrão em extrato para os testes de recuperação e linearidade.

Os padrões foram injetados individualmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após conhecido o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos (solução contendo uma mistura dos quatro padrões – solução mix, a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

5.3.2 Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração

Os métodos de análises cromatográficas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. A etapa de extração em geral é o ponto crítico da análise, por ser responsável por erros nos resultados. As etapas de estabelecimento e otimização das condições de extração consistiram no pré-tratamento da amostra (hidrólise ácida), escolha do adsorvente (C8, C18 e Nexus), condicionamento dos cartuchos (metanol:água; metanol:água:tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5); acetonitrila:água; acetonitrila:água: tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5) e escolha do solvente para eluição (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 com adição de 1% de metanol).

5.3.2.1 Pré-tratamento da amostra

O mel é uma amostra complexa composta por várias substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes. Para diminuir o efeito da matriz na análise cromatográfica alguns trabalhos na literatura sugerem uma etapa de hidrólise ácida antes da extração a fim de romper possíveis ligações de interferentes com os analitos de interesse.

No presente trabalho, foram realizados vários testes para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. A massa de mel foi fixada em 1,0 g, de forma a diminuir o número de variáveis a serem testadas. Os parâmetros estudados

foram: concentração do ácido, volume de ácido a adicionar, tempo de hidrólise e forma de agitação. Na Tabela 5 são apresentados os testes realizados.

Tabela 5 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

A etapa de hidrólise ácida propriamente dita consistiu na adição de um volume de ácido em 1,0 g de mel. A solução de mel (extrato) foi levada para agitação por um determinado tempo. Após a hidrólise ácida os extratos hidrolisados de mel tiveram seu pH ajustado para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e solução tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5. Os extratos de mel após ajuste do pH foram filtrados em membrana de filtração (membrana de acetato de celulose) para retirada de quaisquer partículas que possam estar presentes no extrato.

5.3.2.2 Seleção do adsorvente

Visando obter uma melhor recuperação do analito, três adsorventes foram avaliados, sendo eles:

- EFS Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- EFS ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian;
- EFS C₁₈ – 500 mg/6mL – AccuBOND^{II}ODS – Agilent Technologies.

5.3.2.3 Condicionamento dos cartuchos

Os solventes testados para o condicionamento do cartucho e suas proporções foram:

metanol:água (1:1); metanol:água:tampão (1:1:1); acetonitrila:água (1:1); e acetonitrila:água:tampão (1:1:1).

5.3.2.4 Eluição dos analitos

Para verificar a melhor condição de extração das sulfonamidas foram testados três solventes para eluição, sendo eles: metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5 com adição de 1% metanol.

5.3.2.5 Extração por EFS

A fortificação das amostras para os estudos de extração consistiu na adição de volumes de solução padrão dos analitos no mel, de forma que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 µL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L⁻¹.

Os cálculos realizados foram realizados do seguinte modo: para se obter a concentração de 0,10 mg L⁻¹ das quatro sulfonamidas em 1000 µL de solução final, por exemplo, necessita-se de $10 \times 10^{-3} \text{ mg}$ $\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1} \right)$.

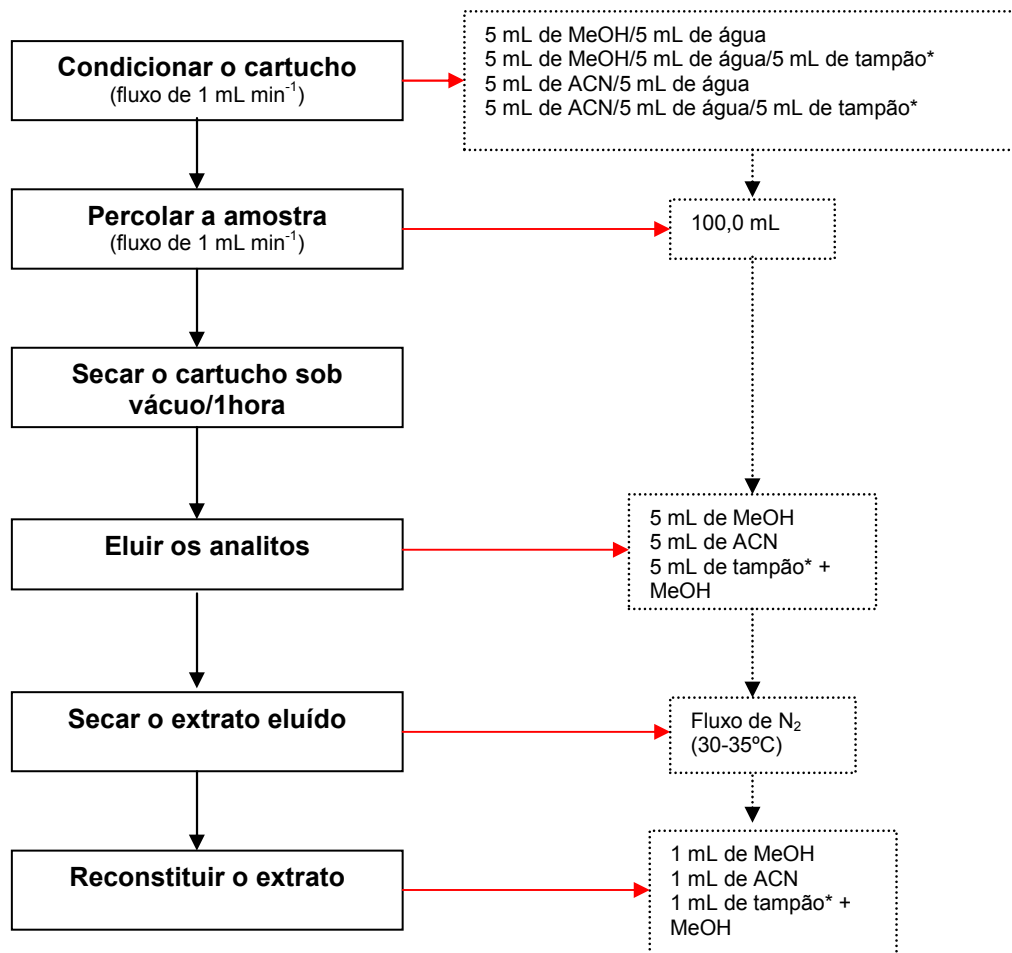
Como foi percolado um volume de 100,0 mL de extrato de mel hidrolisado enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 0,10 mg L⁻¹

$\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow C = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ mg}}{100 \times 10^{-3} \text{ L}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \right)$. Partindo-se de uma solução estoque de 1,0 mg L⁻¹,

o volume da solução padrão mista a ser adicionado no extrato de mel é de 10 mL $\left(C_{\text{padrão}} \cdot V_{\text{padrão}} = C_{\text{amostra}} \cdot V_{\text{amostra}} \rightarrow 1,0 \text{ mg L}^{-1} \times V_{\text{padrão}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 100 \text{ mL} \rightarrow V_{\text{padrão}} = 10 \text{ mL} \right)$.

Para a extração das amostras, testemunha e fortificada, foram realizadas utilizando-se sistema de extração (Manifold) sob vácuo. Antes da percolagem da amostra através do cartucho este foi condicionado com solventes, vazão de fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0 mL da amostra (fluxo de 1 mL min⁻¹), os cartuchos foram secos sob vácuo por 45 minutos. Procedeu-se a eluição dos analitos com 5 mL de solvente, em seguida os analitos eluídos foram secos sob N₂ a temperatura ambiente e posteriormente retomados com 1000 µL de solvente. Os extratos foram em seguida injetados para análise cromatográfica.

A Figura 13 mostra um esquema com as etapas do procedimento analítico para os testes de extração para determinação de sulfonamidas em mel.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

Figura 13 - Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração EFS.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA [60] e Comunidade

Européia (*EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE*) [109] para análise de resíduos em alimentos.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se testes em quintuplicata, de padrões e amostras testemunhas, com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada sulfonamida.

5.4.2 Linearidade

A região linear de resposta do detector foi determinada através de cálculo de regressão linear da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções-padrão assim como com amostras testemunhas fortificadas nas mesmas concentrações que as soluções-padrão. As soluções foram preparadas a partir de uma solução intermediária de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram injetadas cinco vezes. As concentrações utilizadas para o estudo das sulfonamidas foram: 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa linear de trabalho). Construiu-se o gráfico de calibração para os compostos estudados, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo x e os valores das áreas dos picos no eixo y.

A linearidade e a sensibilidade do método foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica. A linearidade foi expressa como o coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

5.4.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O Limite de detecção (LD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas. Para isso, foram estabelecidas as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. O Limite de quantificação (LQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas.

Determinou-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse para calcular os limites de detecção e de quantificação.

5.4.4 Estudo de recuperação

Os estudos de recuperação foram utilizados para avaliar o método quanto à precisão e exatidão; este foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 5.5).

O procedimento experimental consistiu da adição de volumes da solução padrão no mel, para que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 μL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L^{-1} .

5.4.4.1 Precisão

Foram realizados dois testes quanto à precisão do método. Verificou-se a precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de duas amostras de mel fortificadas a concentração de 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, os testes foram realizados em quintuplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Já a precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de duas amostras de mel em 3 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 25, 50 e 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

5.4.4.2 Exatidão

Os resultados e as conclusões com os dados obtidos do método analítico foram submetidos à avaliação estatística, e a expressão dos resultados foi apresentada em um determinado intervalo de confiança relacionado com os valores de exatidão e precisão dos resultados. Aplicou-se o teste “t” *de Student* nos resultados.

5.5 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras comerciais de mel, coletadas no Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (estados vizinhos ao Maranhão). Na Figura 14 é apresentado um esquema com o método proposto para a determinação de sulfonamidas em mel.

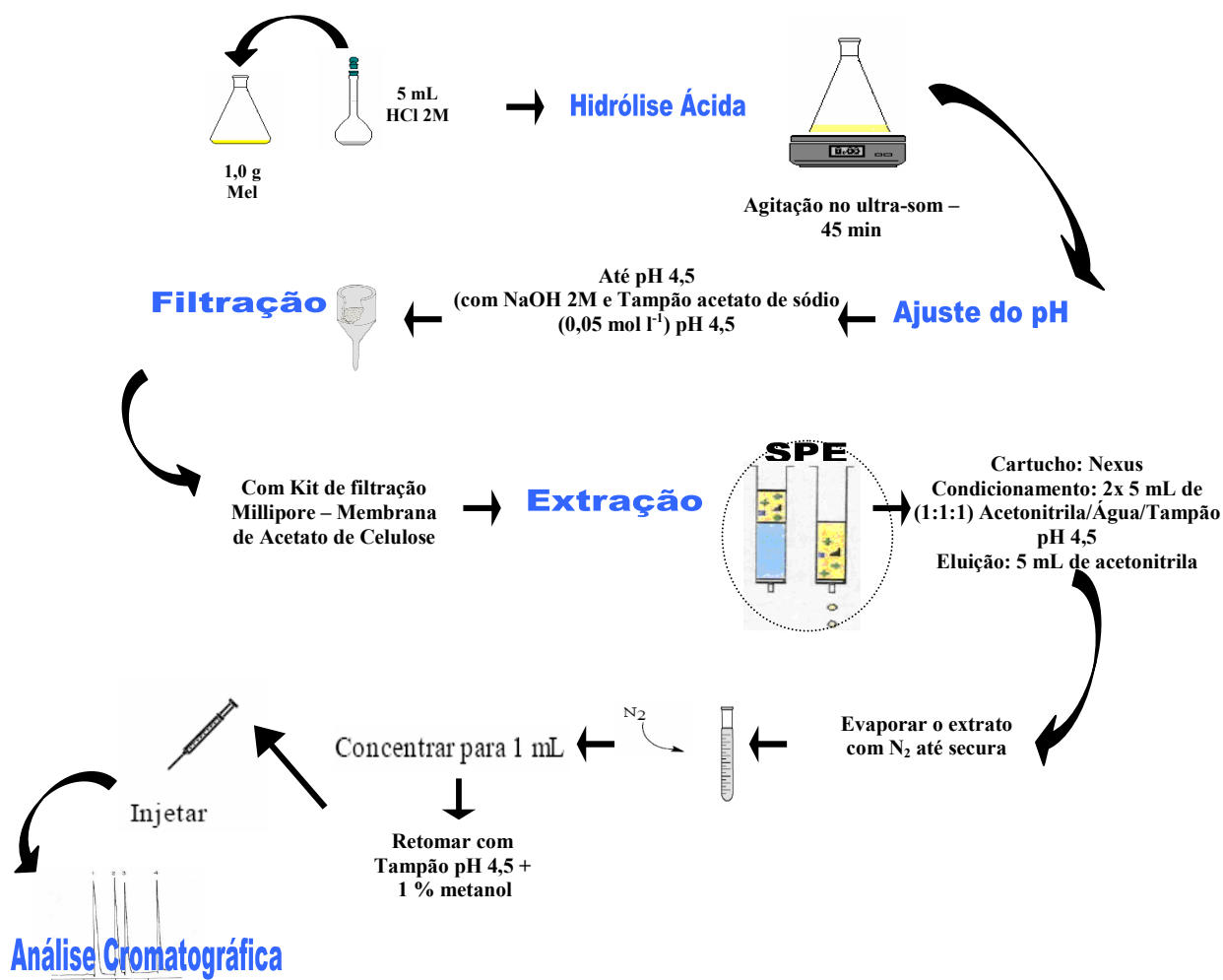


Figura 14 - Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por ZOTOU e VASILIAOUDOU [11] para a determinação de sulfonamidas em mel por HPLC-DAD que emprega solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6; como fase estacionária a coluna C18 e fase móvel: metanol e solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6, com adição de 1% de ácido acético, no modo isocrático. Os autores realizaram testes de extração em fase sólida com vários cartuchos e solventes para eluição. Para a etapa de extração foi utilizado o método recomendado por MAUDENS *et al.* [63] como referência inicial, que utilizou hidrólise ácida com ácido clorídrico 2M e extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C18.

6.1 SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Na Tabela 6 são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 300 nm para as sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram posteriormente selecionados na determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos. Os testes foram realizados com as sulfonamidas com concentração em 1 mg L⁻¹ em metanol.

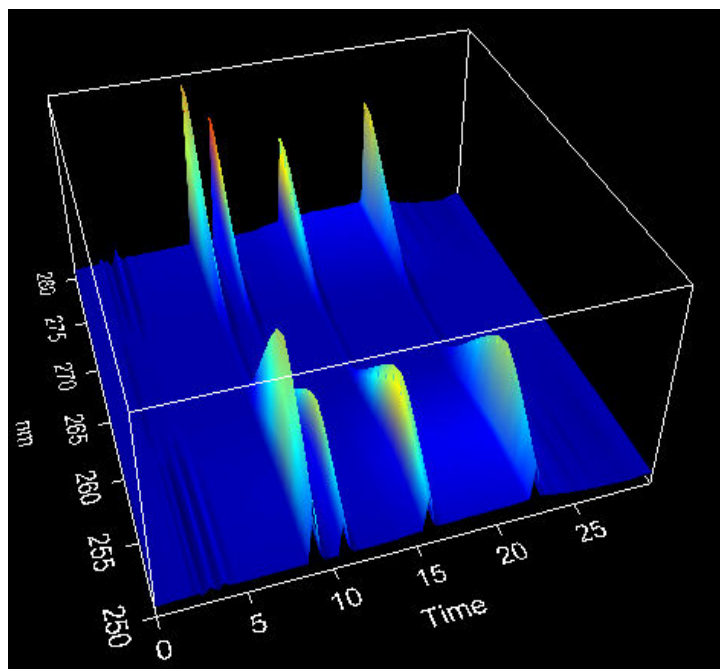
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.

Composto	λ máx (nm)
Sulfadiazina	270
Sulfadimetoxina	272
Sulfadimidina	269
Sulfatiazol	260

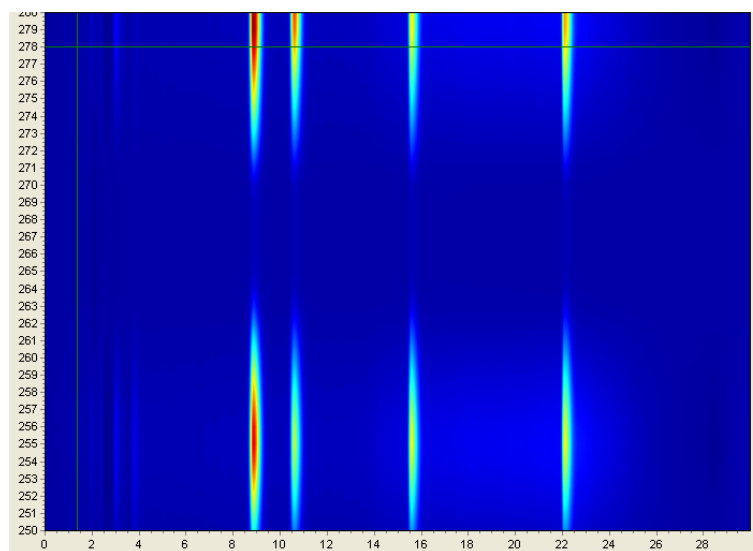
Nas Figuras 15 (a e b) e 16 (a e b) são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção na região do UV (250-280 nm) e os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda na região UV em estudo.

Os resultados encontrados em ambos os equipamentos confirmam o comprimento de onda de máxima absorção, 278 nm, para a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e

sulfadimetoxina. Para sulfatiazol, embora a máxima absorção não ocorra em 278 nm, resultados satisfatórios foram obtidos neste comprimento de onda, justificando a escolha deste comprimento de onda para os quatro compostos em estudo.

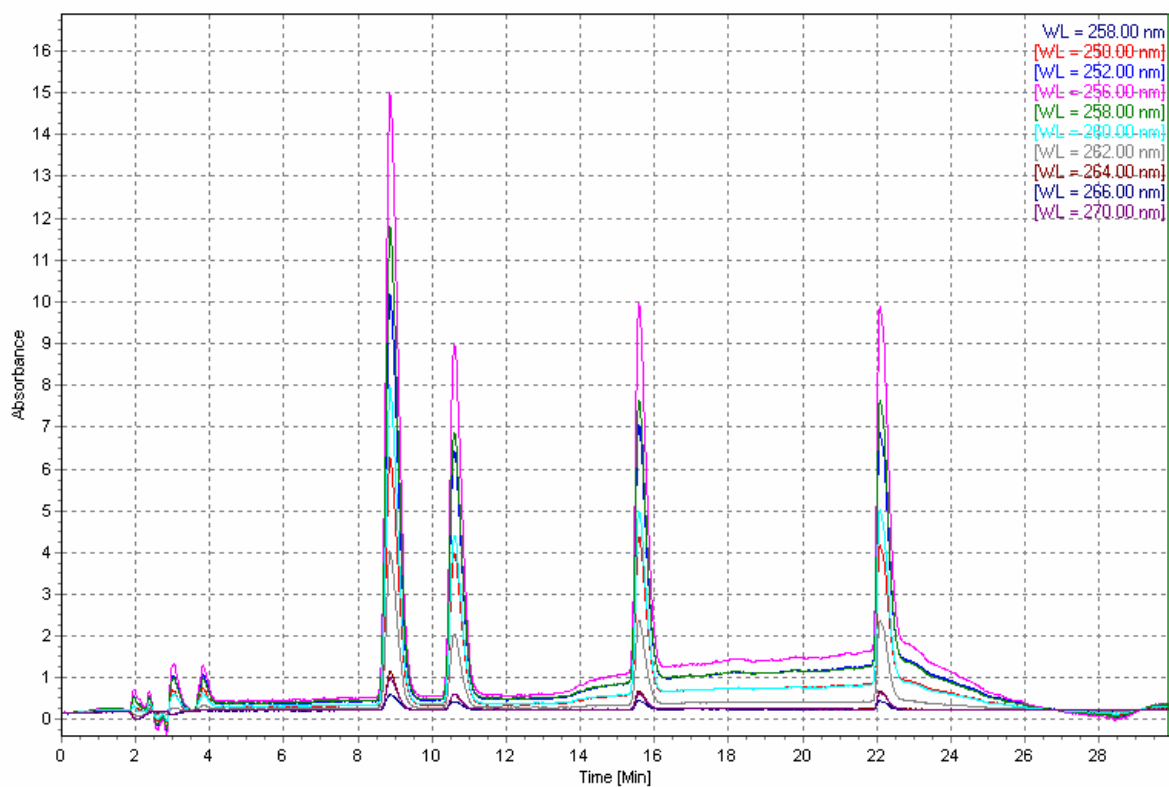


(a)

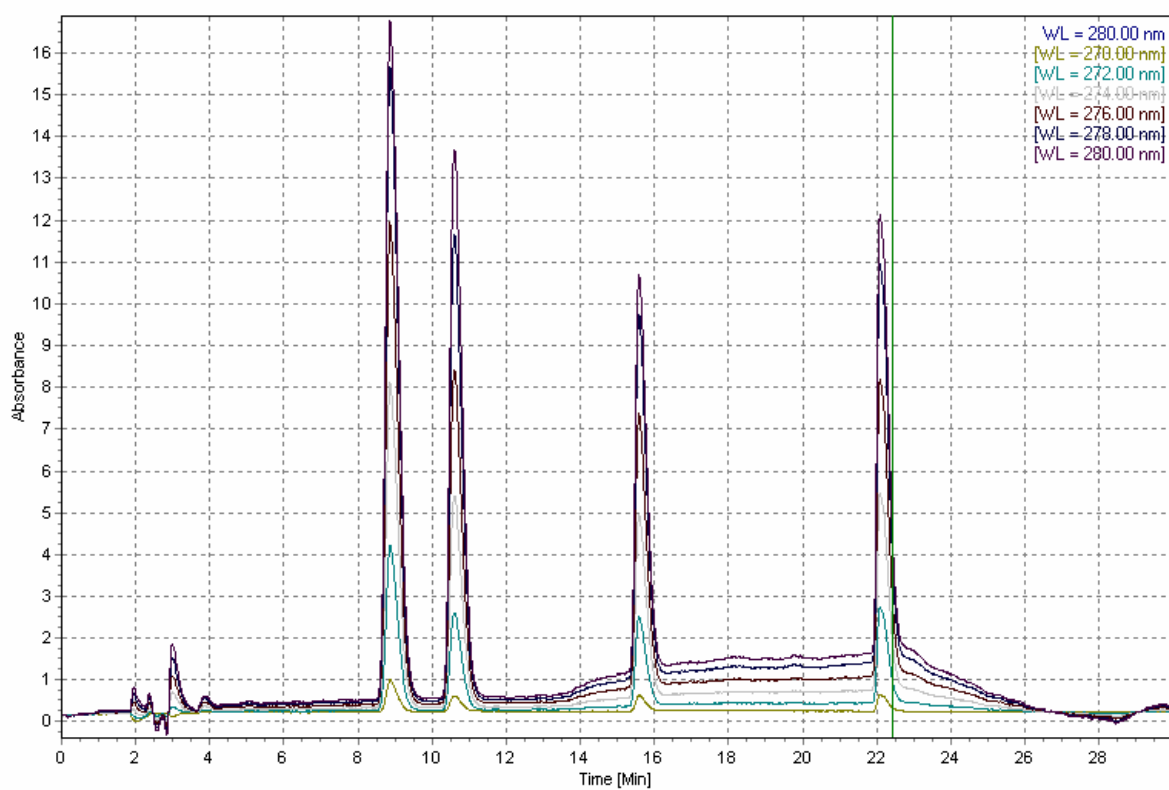


(b)

Figura 15 - Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.



(a)



(b)

Figura 16 - Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatográfico: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm

6.2 SELEÇÃO DA COLUNA

Para se obter uma melhor separação cromatográfica foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas duas colunas analíticas, uma com fase C_8 (mais polar), e com uma coluna C_{18} (menos polar). Com ambas as colunas obteve-se uma boa resolução e boa separação dos compostos de interesse. A Figura 17 mostra uma sobreposição dos cromatogramas resultantes da injeção da mistura dos padrões em concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Selecionou-se a coluna C_{18} em função dos maiores valores de áreas dos picos das sulfonamidas, confirmando-se os dados encontrados na literatura que citam maior utilização da coluna C_{18} .

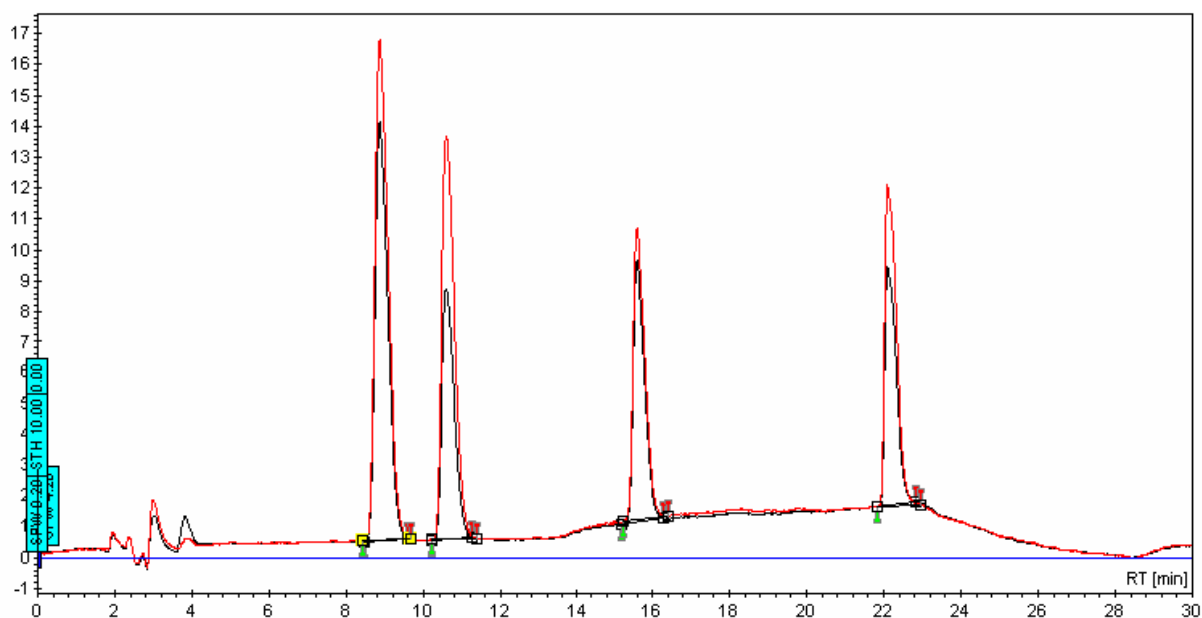


Figura 17 - Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando C_{18} (cromatograma vermelho), C_8 (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).

6.3 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é muito importante na separação dos analitos devido à interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a proporcionar uma resolução adequada dos analitos, boa separação, menores tempos de

retenção, mantendo, entretanto, a solubilidade dos analitos no decorrer da separação cromatográfica e, principalmente, sem interferir na detecção dos analitos de interesse.

6.3.1 Seleção do pH da fase móvel

As sulfonamidas estudadas apresentam caráter anfótero (solubilidade entre 1 e 192 mg/100mL de água a 27°C) e valores de pK_a entre 6,21 e 7,45. Vários trabalhos na literatura apontam o uso de solução-tampão de acetato de sódio (pH 4,5) na fase móvel, justificando que seu uso mantém as espécies iônicas estáveis no decorrer das análises. A escolha do pH da solução-tampão constitui-se, então, em um fator importante. Foram feitos testes para verificar em qual pH as sulfonamidas estudadas teriam a melhor resposta no detector DAD. Os valores de pH testados foram: 3,5; 4,5 e 5,5, como apresentado na Figura 18. Para a realização dos testes de pH utilizou-se acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Em todos os valores de pH obteve-se boa separação e resolução. Entretanto, em pH 4,5 melhores resultados foram obtidos, quando se comparando as áreas dos picos nos três valores de pH.

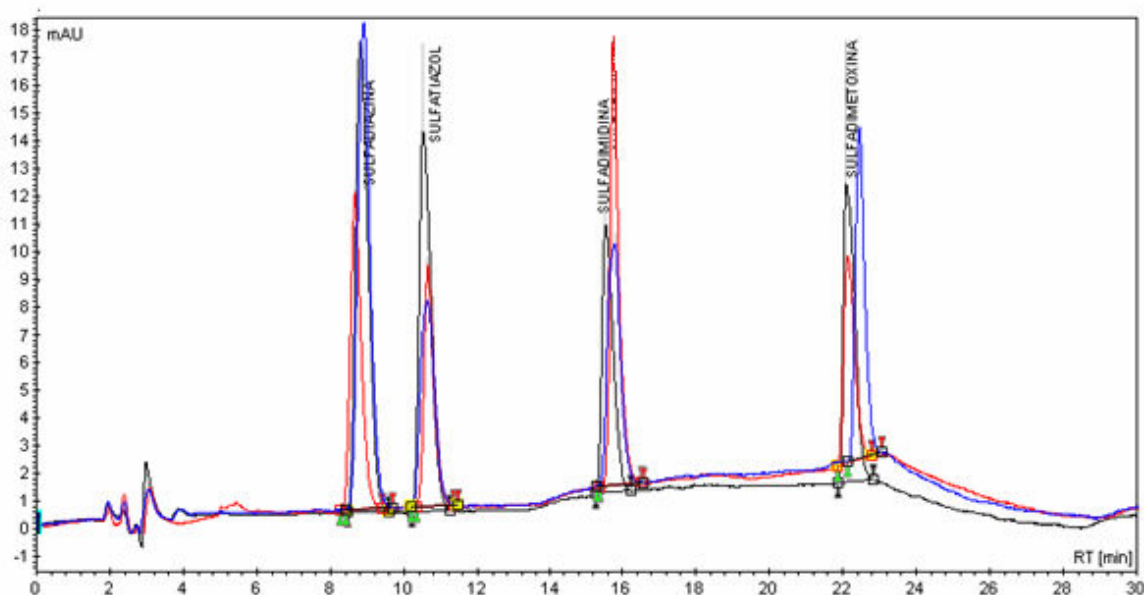


Figura 18 - Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto)

6.3.2 Composição da fase móvel

No Quadro 4 são apresentados os testes realizados no estudo da composição da fase móvel.

Teste	Gradiente			Composição da Fase móvel	
	t (min)	%	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
Teste 1	0	10:90	1,0	Metanol	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 2	0	10:90	1,0	Metanol	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 3	0	10:90	1,0	Metanol	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 4	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 5	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 6	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			

*t – tempo em minutos; % - proporção de solvente

Quadro 4 - Testes para seleção da composição da fase móvel

Quando metanol foi empregado na fase móvel, independente da composição da fase aquosa, não foi possível observar todos os picos das sulfonamidas injetadas. Em todos os

testes em que foi utilizado este solvente, observou-se somente os picos da sulfadiazina, sulfatiazol e sulfadimidina, não sendo identificando sinal para sulfadimetoxina. Este fato pode ser explicado em função do poder de arraste do metanol, que não deve ter sido suficiente para detectá-la nas condições estabelecidas. Os resultados dos testes feitos com tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e solução de ácido acético 0,1% apresentaram áreas dos picos maiores que as obtidas quando utilizando água na fase móvel. Na Tabela 7 são apresentados a quantidade e os respectivos compostos separados no estudo da composição da fase móvel. Os cromatogramas típicos obtidos com os melhores resultados para cada teste de composição da fase móvel são apresentados nas Figuras 19, a e b.

Para os testes empregando-se acetonitrila, melhores resultados foram encontrados para todas as composições da fase móvel. Utilizando-se ACN: solução de ácido acético 0,1% e ACN: tampão acetato de sódio pH 4,5, resolução e separação adequadas foram observadas para as quatro sulfonamidas. Acetonitrila e água apresentaram melhores resultados sendo, assim, selecionados como os solventes adequados para a fase móvel (Figura 19 - b).

No ANEXO 03, são apresentados todos os cromatogramas dos testes realizados nos estudos da composição da fase móvel.

Tabela 7 – Estudo da composição da fase móvel.

Teste	Quantidade de compostos separados	Compostos separados
01 (MeOH:H ₂ O)	03	SDZ, STZ, SDD
02 (MeOH:TAMPÃO)	03	SDZ, STZ, SDD
03 (MeOH:ÁGUA ÁC 0,1%)	03	SDZ, STZ, SDD
04 (ACN:H ₂ O)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
05 (ACN:TAMPÃO)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
06 (ACN: ÁGUA ÁC 0,1%)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM

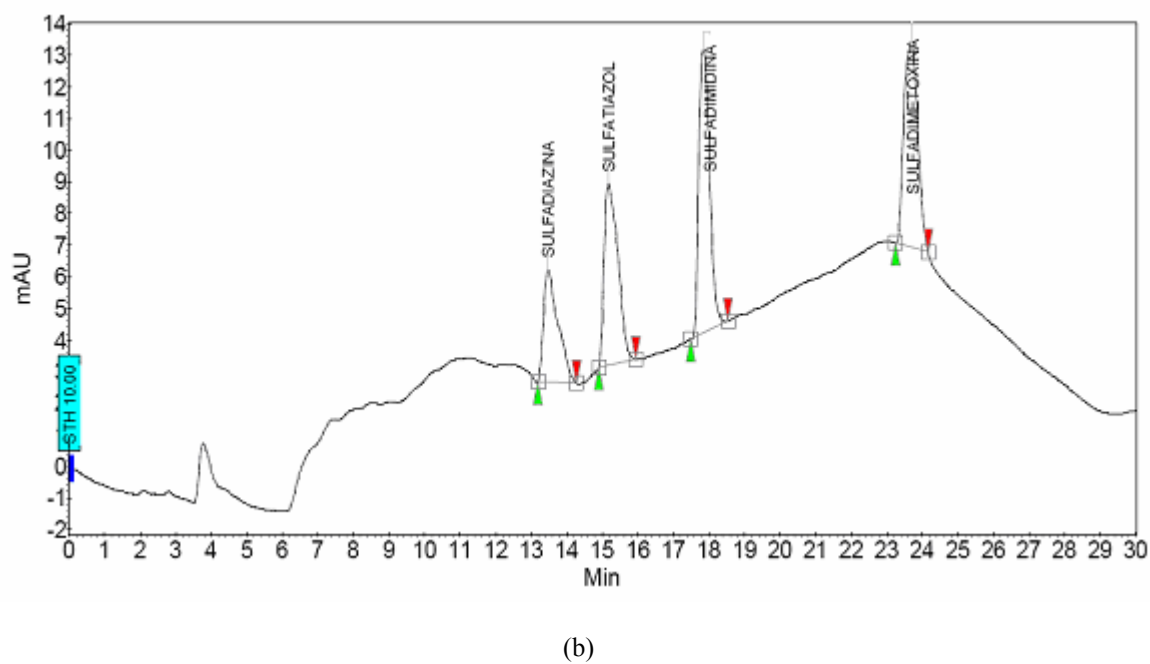
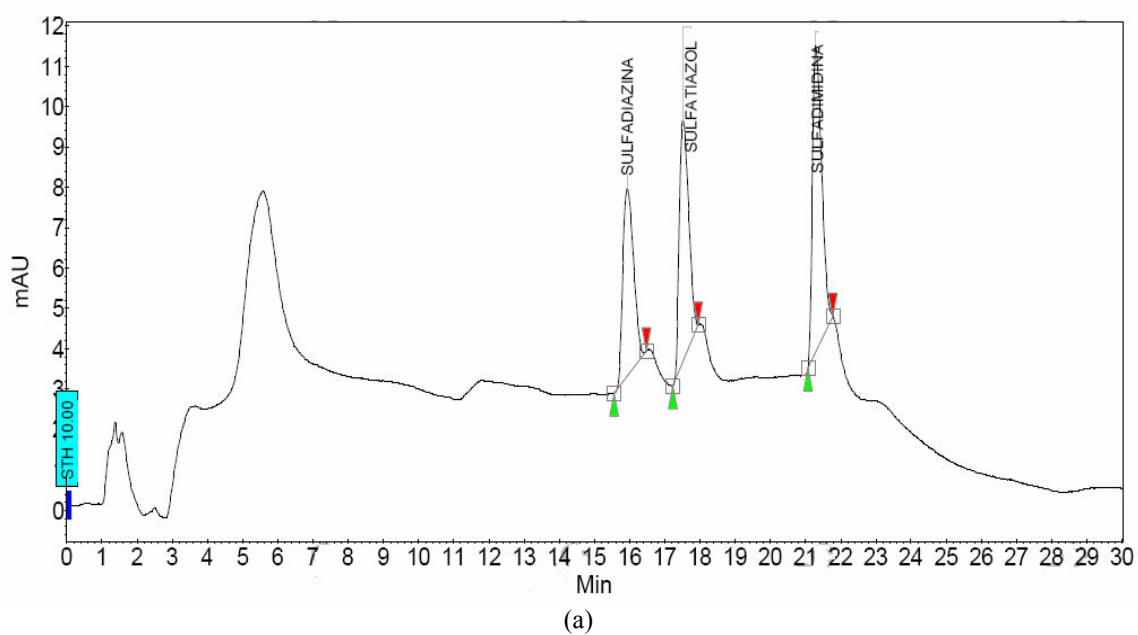


Figura 19 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água

6.3.3 Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho

As sulfonamidas são compostos ligeiramente solúveis em água, e apresentam maior solubilidade em soluções ácidas ou básicas e em solventes orgânicos [9]. Segundo Sun *et al.* [9], a solução de ácido acético 0,1% quando utilizada como solvente para as soluções de trabalho, proporciona picos cromatográficos mais definidos. Para Pecorelli *et al* [18], as soluções de trabalho devem ser preparadas usando-se solução tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, uma vez que favorecem a estabilidade das sulfonamidas.

Para se obter resolução e separação cromatográfica adequadas foram testados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho. Dois testes foram realizados, utilizando-se solução-tampão de acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e utilizando-se solução de ácido acético 0,1%. Para ambos os solventes foram obtidos resultados satisfatórios, entretanto, a solução tampão (Figura 20) forneceu maiores áreas dos picos cromatográficos, tendo-se optado por este solvente para a realização das demais análises.

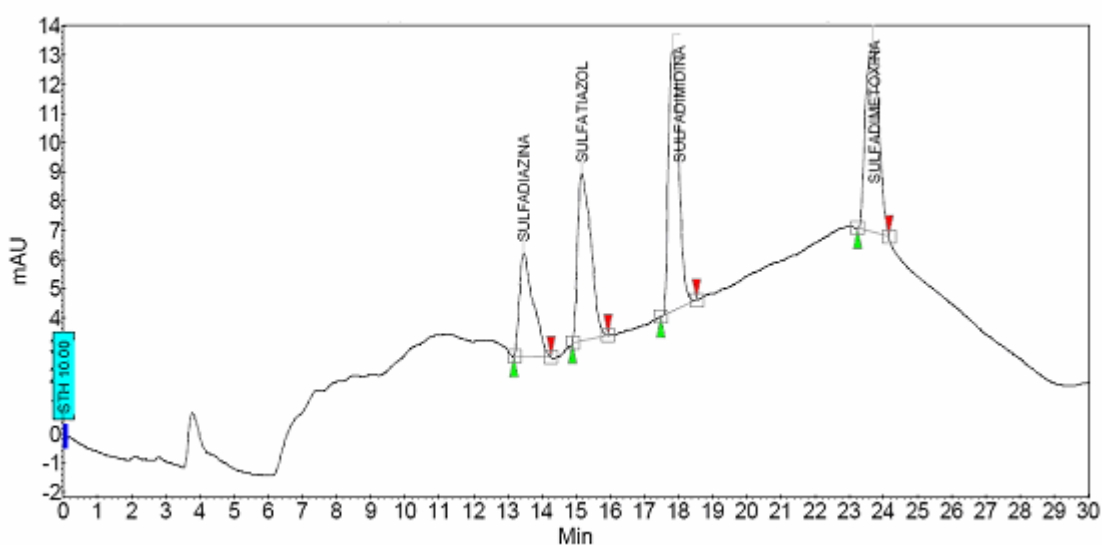


Figura 20 - Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5.

Outro teste realizado foi a otimização do tempo de análise. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação e a resolução dos picos, o fluxo da fase móvel foi variado de $0,4$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados demonstraram que quanto menor o fluxo da fase móvel sulfadiazina e sulfatiazol apresentam tempos de retenção bem próximos dificultando a

separação dos picos. Em fluxos maiores ocorre uma melhor separação. O fluxo de 1 mL min⁻¹, apresentou os melhores resultados podendo-se observar separação dos picos satisfatória.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Depois de selecionadas as condições cromatográficas foram realizados cinco repetições em concentração 1,0 mg L⁻¹ para cada sulfonamida, com os melhores resultados dos testes anteriores. Na Tabela 8 são listadas as condições cromatográficas selecionadas. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 8 - Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.

Item	Condições
Equipamento	CLAE-DAD
Coluna	CL-18, 150mm x 4,6mm, 4µm - Phenomenex
Coluna de Guarda	KJO-4282 – Phenomenex
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Água
Proporção dos solventes	10:90
(A:B)	15:85
	30:70
	40:60
	15:85
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	278 nm

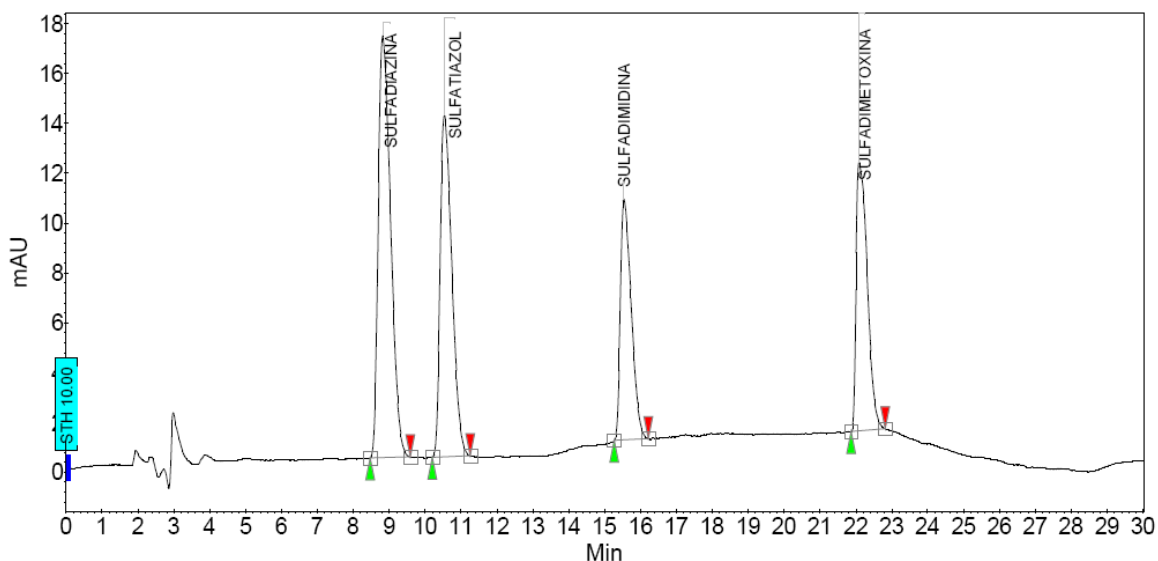


Figura 21 - Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L⁻¹.

A estabilidade dos padrões também foi avaliada nesta etapa. A avaliação da estabilidade das soluções intermediárias utilizadas na metodologia analítica foi realizada com o objetivo de verificar a ocorrência de degradação do analito. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos padrões durante a estocagem a -10°C em um período de 3 meses. As amostras foram analisadas após 1 semana, 1, 2 e 3 meses. Definiu-se como critério de aceitação variações menores que 20% em relação à concentração inicial, levando-se em consideração possíveis alterações ocasionadas pelo próprio armazenamento.

Verificou-se que a estabilidade dos padrões é mantida por até 3 meses e 7 dias, após esse período a concentração dos padrões sofre uma perda média do analito de aproximadamente 40 %. A Figura 22 apresenta um gráfico com a percentagem de degradação das soluções-padrão.

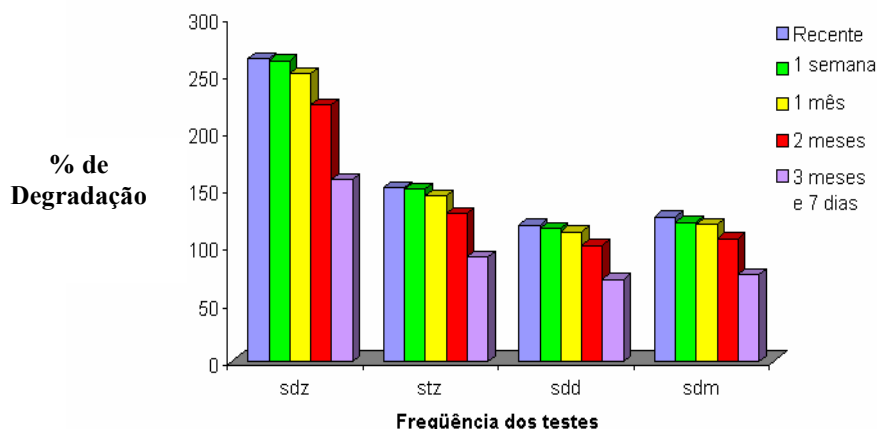


Figura 22- Estudo da degradação das soluções-padrão

6.5 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS

A metodologia de extração utilizada neste trabalho baseou-se em estudos de; SUN *et al.* [9]; BISWAS *et al.* [71]; WANG *et al.* [67]; ZOTOU e VASILADOU [11]; MAUDENS, ZHANG E LAMBERT [63]; PECORELLI *et al.* [18]; MARTEL e ZEGANNE [64]; PANG *et al.* [65]; CANCHO-GRANDE *et al.* [116]; FURUSAWA [14]; STOEV & MICHAILOVA [80]; VIÑAZ *et al.* [86]; HORIE *et al.* [66].

Os testes foram realizados utilizando-se extrato de mel, preparado pela diluição de 1,0 g de mel em água + solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (amostra sem hidrólise ácida) e extrato hidrolisado de mel (1,0 g de mel + solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}). Foram utilizados volumes de 100,0 mL de amostras fortificadas com as sulfonamidas de interesse. Para os testes preliminares utilizou-se nível de fortificação de 50 ng g^{-1} de cada sulfonamida. A extração foi realizada em triplicata e as injeções cromatográficas também foram feitas em triplicata. Avaliou-se a recuperação de cada composto após os procedimentos de extração, comparando-se com a injeção, direta dos padrões das sulfonamidas. Uma vez estabelecidas as condições, novos testes foram realizados, utilizando-se três níveis de fortificação (25 , 50 e 100 ng g^{-1}).

6.5.1 Pré-tratamento da amostra

Em síntese, podemos definir o mel como um produto açucarado, constituído em sua maioria por açúcares. As sulfonamidas têm como característica formarem ligações com açúcares, principalmente ligações com açúcares redutores, podendo formar uma variedade de diferentes compostos açúcar-sulfonamida [114] o que poderia modificar o comportamento dos picos cromatográficos pelo efeito de matriz. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre açúcar e sulfonamida, estudada por Sheth *et al.* [114]. No citado estudo, realizou-se uma reação de uma molécula de sulfatiazol com uma molécula de açúcar redutor, ocorrendo a formação de uma base de Schiff (n-glucosilamina) e liberação de uma molécula de água, formando-se em seguida um composto de Amadori e, após um longo período de armazenamento, o autor comenta a possibilidade de formação de outros produtos da reação de Maillard. O referido autor cita também que sobre condições ácidas a tendência é a formação de sulfonamidas livres devido a ionização do grupo amina. O autor ainda afirma que a ligação de açúcares-sulfatiazol poderá ocorrer com outras sulfonamidas também.

Schwaiger e Schuch [115] estudaram e provaram que para a determinação de sulfonamidas em mel é necessário uma etapa de hidrólise ácida antes da análise cromatográfica para quebrar as ligações açúcar-sulfonamida. Observaram também que após a hidrólise ácida é necessário realizar um ajuste no pH do meio para 4,5 para que as sulfonamidas permaneçam estáveis no meio.

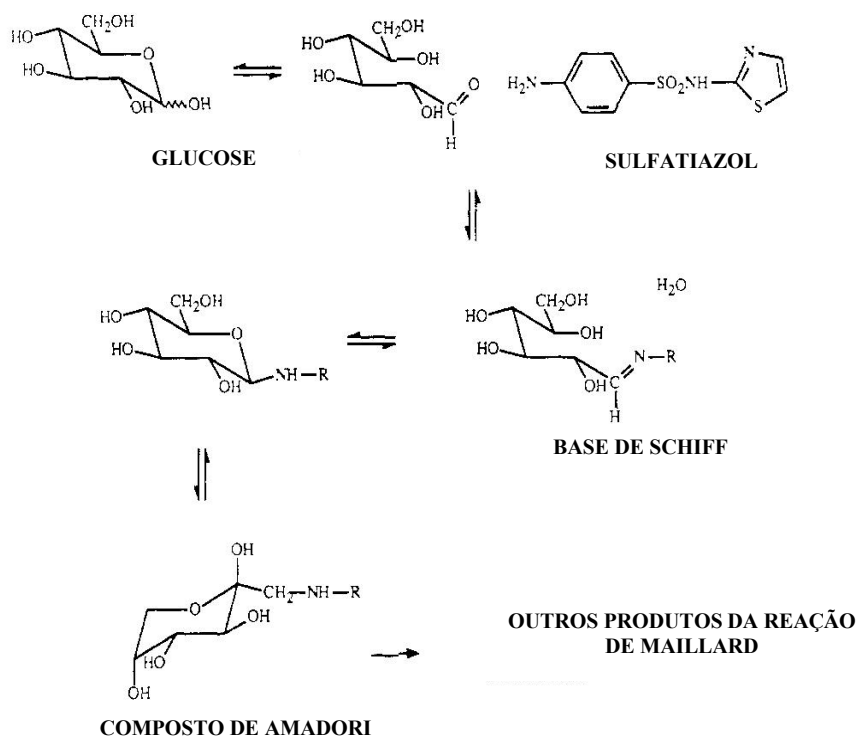


Figura 23 – Esquema da reação açúcar-sulfonamida.
 Fonte: adaptado de [114].

Inicialmente foram realizados testes para selecionar as melhores condições para o pré-tratamento da amostra. Na Tabela 9 são apresentados os testes realizados.

Tabela 9 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

Após definidas as condições para a hidrólise foram realizados dois testes com a matriz. O primeiro consistiu somente na diluição de 1,0 g de mel em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5, neste caso não utilizou-se hidrólise ácida. O segundo teste consistiu na realização de uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico, como descrito na seção 5.3.2.1. Os resultados dos testes de hidrólise mostraram que as variáveis que mais influenciam na eficiência da hidrólise ácida são concentração e volume de ácido adicionado e tempo de agitação. A forma de agitação influencia, mas não como as outras variáveis. A concentração do ácido mostrou ser uma variável muito importante, sendo a concentração de 2M a mais eficiente. O volume de ácido adicionado influencia tanto na dissolução quanto na eficiência da hidrólise. O tempo de agitação também está diretamente ligado à eficiência da hidrólise. O conjunto de condições: concentração de 2M e tempo de 30 minutos, apresentou bons resultados, mas não melhores dos que os apresentados na mesma concentração e tempo de 45 minutos.

Das condições estudadas, os melhores resultados foram os obtidos pelo seguinte conjunto: concentração de 2M, 2 mL de ácido e 45 min. O volume de 2 mL propiciou melhores resultados, no entanto, dificulta a dissolução do mel, tendo-se optado pela adição de volume de 5 mL. A agitação em banho ultra-som foi escolhida por apresentar resultados um pouco melhores do que os encontrados com o uso da mesa agitadora. Nas Figuras 24 - a e b, são apresentados os cromatogramas correspondentes a este teste. Pode-se observar através das Figuras que sem hidrólise do mel ocorreram muitos ruídos, porém a evidência mais importante é que não foram observados os picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas de interesse. Na amostra testemunha fortificada foram observados vários picos interferentes em tempos de retenção próximos aos dos picos das sulfonamidas de interesse. A

ocorrência destes picos cromatográficos pode ocasionar diminuição nas áreas dos picos cromatográficos das sulfonamidas de interesse o que pode levar a resultados errados. Na Figura 24 b é apresentado um cromatograma típico de uma amostra de testemunha fortificada sem passar por uma etapa de hidrólise ácida.

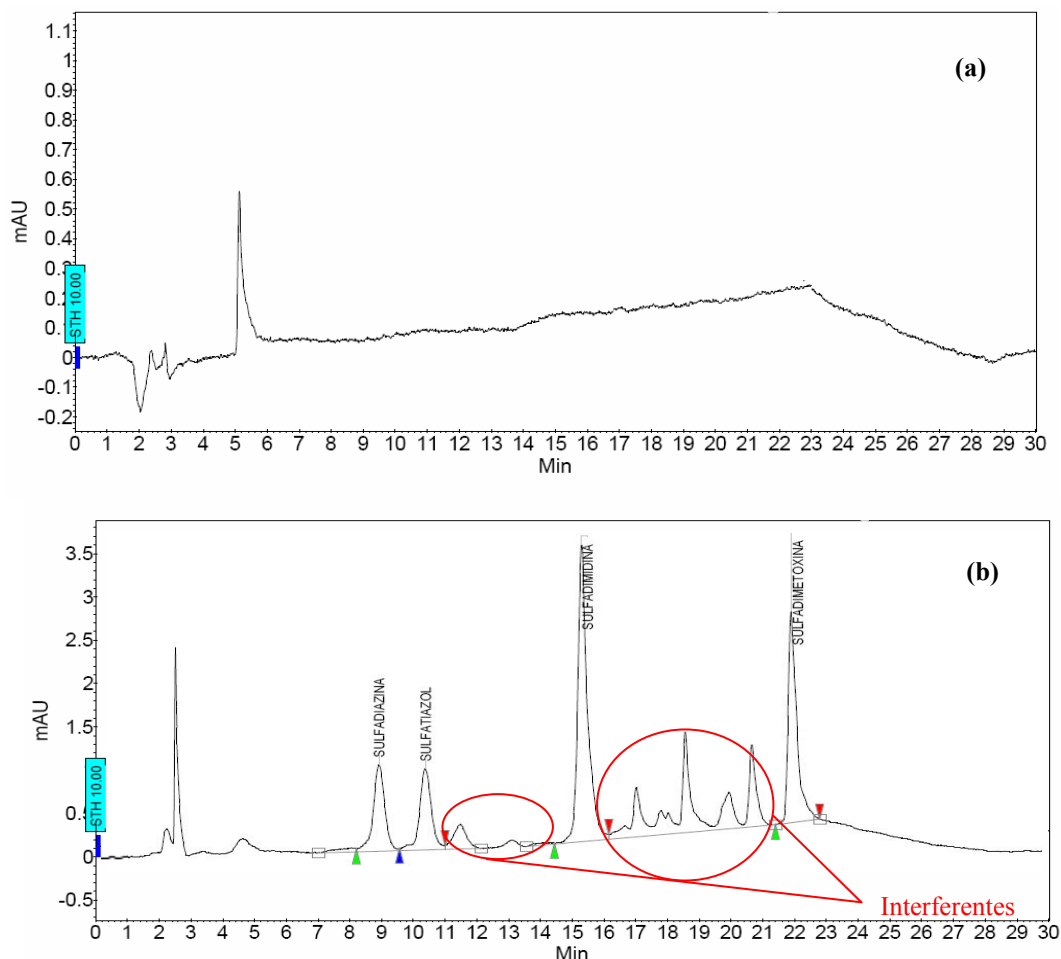


Figura 24 - Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , sem hidrólise ácida.

De um modo geral, todos os testes de hidrólise mostraram-se etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. Para o mel submetido à etapa de hidrólise ácida, foi possível perceber melhora do ruído no cromatograma, não sendo também observados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Os melhores resultados são mostrados nas Figuras 25 - a e b.

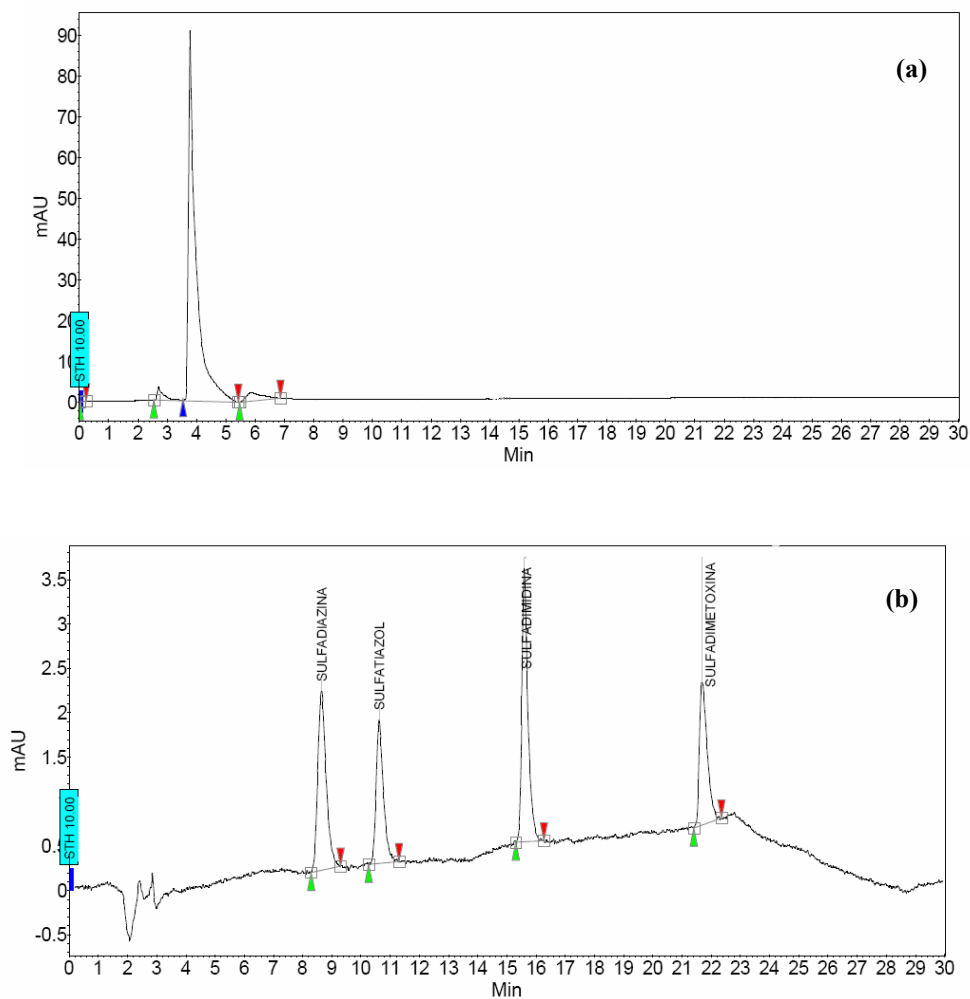


Figura 25 - Cromatogramas obtidos nos testes de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , com hidrólise ácida.

Pode-se evidenciar por este estudo a importância da etapa de hidrólise ácida, observando-se no cromatograma sem hidrólise a presença de vários picos interferentes próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, o que levou a uma redução das áreas dos picos dos compostos. Com a amostra de mel submetida à hidrólise ácida o cromatograma quase não evidenciou interferentes, tendo apresentado separação adequada dos picos das sulfonamidas.

6.5.2 Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração por fase sólida

Os testes realizados para escolha do adsorvente, solvente para condicionamento do cartucho e solvente para eluição tiveram por objetivo escolher o conjunto de condições que oferecessem a melhor eficiência na extração, ou seja, os melhores resultados de recuperação. As recuperações obtidas na extração de compostos nos níveis de concentração estudados deve ser entre 70-120%. As fases e condições utilizadas nas extrações são citadas na Tabela 10.

Cabe mencionar, que a eficiência da extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na amostra de mel fortificada em relação ao analito em solução padrão.

Tabela 10 - Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)

Teste	Cartucho	Condicionamento
Teste 1	C-8	MA/MAT/AA/AAT*
Teste 2	C-18	MA/MAT/AA/AAT
Teste 3	Nexus	MA/MAT/AA/AAT

***MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.**

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos testes de eficiência de extração. Quando metanol foi utilizado como solvente de eluição recuperações inferiores a 70% foram obtidas.

Tabela 11 - Resultados dos testes de eficiência de extração

Analito	Eluente	Eficiência da extração (% de recuperação)											
		C8 (teste 1)				C18 (teste 2)				Nexus (teste 3)			
		MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT
SDZ	MeOH	42	41	49	48	53	64	56	60	57	60	62	65
	ACN	61	67	65	70	66	70	68	73	73	79	80	84
	Tampão	58	62	61	62	67	73	70	76	73	77	79	83
STZ	MeOH	39	45	40	48	55	51	51	56	51	58	56	59
	ACN	56	60	55	65	62	64	63	71	60	67	75	84
	Tampão	51	60	55	60	55	63	66	70	62	66	68	76
SDD	MeOH	42	45	44	47	55	61	64	63	53	60	53	63
	ACN	60	65	62	66	63	68	67	66	72	76	74	79
	Tampão	62	64	63	57	66	72	74	68	64	69	70	78
SDM	MeOH	43	47	42	45	51	59	54	61	55	58	52	61
	ACN	60	63	62	67	70	64	67	63	73	76	66	79
	Tampão	55	58	56	58	72	75	74	78	71	74	78	82

Analisando-se os resultados da Tabela 11, observa-se que os cartuchos Nexus proporcionaram recuperações, de 51 a 65%, em todos os tipos de condicionamento realizados. Para os cartuchos C18, as recuperações variaram entre 51-64%. Com cartucho C8 menores recuperações foram obtidas de 41-49%, supondo-se problemas com a polaridade da fase.

Dos condicionamentos testados, os solventes acetonitrila/água/tampão foram os que apresentaram melhores resultados para todos os cartuchos. A utilização de tampão no condicionamento proporcionou melhores resultados. Os solventes metanol/água foram a sequência que apresentaram menores valores de recuperação.

Para a eluição, verificou-se que, com acetonitrila, as recuperações foram melhores dos que as obtidas quando metanol foi utilizado como solvente de eluição dos analitos. As recuperações encontradas foram de 51-84%. Analisando-se os resultados dos testes utilizando-se acetonitrila como eluente, observou-se que com cartuchos Nexus, melhores recuperações foram também obtidas (60-84%). O cartucho C18 também apresentou resultados satisfatórios (62 a 73%). Para o cartucho C8, menores recuperações (55-70%) foram obtidas.

As extrações utilizando tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹), pH 4,5 e adição de 1% de metanol como eluente para os analitos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com acetonitrila. As recuperações para os cartuchos Nexus foram de 62-83%. Já

para o cartucho C18 foram de 55-79% e para o cartucho C8 as recuperações foram de 51-62%.

Com base nos resultados encontrados, quanto ao material que constitui a fase sólida do cartucho, pode-se observar que o cartucho Nexus apresentou uma maior interação com as moléculas dos analitos dos que as fases sólidas C8 e C18 obtendo-se melhores resultados em todos os testes. Os resultados dos testes realizados com os cartuchos C8 não foram satisfatórios para nenhuma das condições testadas. Pressupõe-se que a polaridade da fase possa ter interferido na extração. E como eluente a acetonitrila apresentou os melhores resultados, incluindo secagem mais rápida sob fluxo suave de nitrogênio.

Objetivando-se promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes também foram realizados dois testes de *clean-up*, ambos utilizando-se cartuchos de *Florisil*, 500 mg/6mL. O primeiro teste (*clean-up* 1) foi realizado com 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila e o segundo teste (*clean-up* 2) foi realizado com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após a passagem das amostras pelos cartuchos de *Florisil*, submeteu-se a fluxo suave de nitrogênio até a secura. As amostras foram retomadas com 1 mL de acetonitrila e injetadas. A Figura 26 apresenta os resultados dos testes de % de recuperação das quatro sulfonamidas estudadas com as duas condições de *clean-up* testadas.

Dentre os procedimentos empregados, o que demonstrou maior recuperação do analito foi o que empregou 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila. No entanto, estes resultados não foram melhores do que os obtidos quando não realizado procedimento de *clean up* com cartuchos de *Florisil*, optando-se, portanto pela não utilização deste passo nas demais análises para a determinação de sulfonamidas em mel.

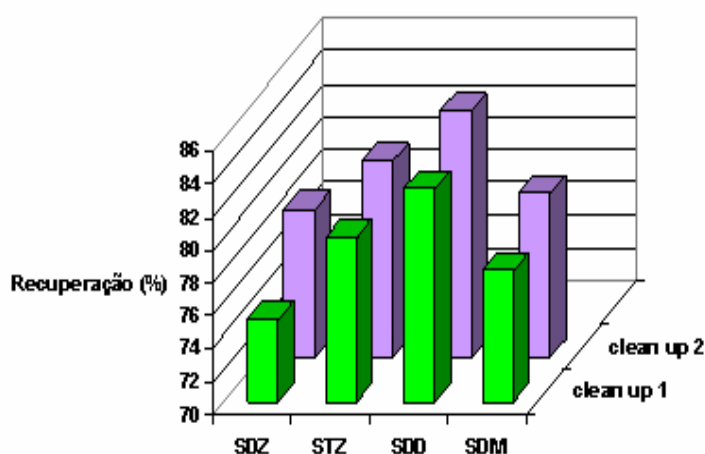


Figura 26 - Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de *clean-up*.

Depois de selecionadas todas as condições de extração, foram realizados novos experimentos de extração, em triplicata, em três níveis de concentração: 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para otimizar as condições de extração do método desenvolvido. Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração selecionadas.

Tabela 12 – Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.

Composto	Concentração		
	25 ng/g	50 ng/g	100 ng/g
SDZ			
Rec±RSD, (%)	80 ± 12,50	83 ± 8,43	85 ± 5,88
STZ			
Rec±RSD, (%)	71 ± 15,49	76 ± 11,84	80 ± 7,50
SDD			
Rec±RSD, (%)	77 ± 12,99	81 ± 9,88	83 ± 6,02
SDM			
Rec±RSD, (%)	75 ± 13,33	79 ± 10,13	81 ± 6,17

*n=3

Na Figura 27 é apresentado o cromatograma no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹ obtido após estabelecimento das condições de extração.

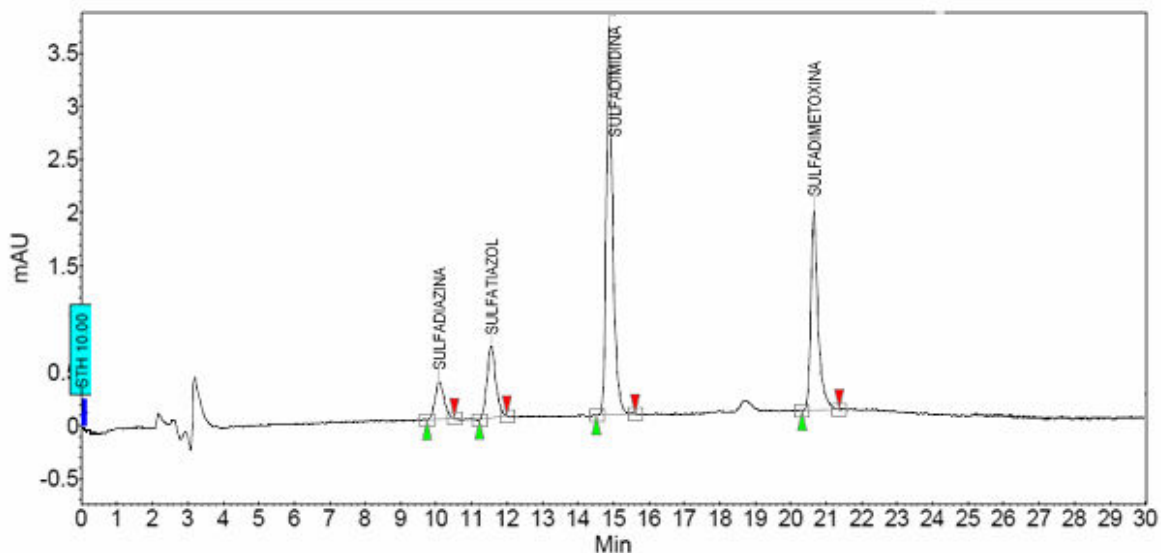


Figura 27 - Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas e otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica, como no preparo da amostra para a determinação das sulfonamidas por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de sulfonamidas no mel. Antes da validação, verificou-se a conformidade do sistema seguindo as recomendações da *Food and Drug Administration* – FDA, 2004.

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

6.6.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros da conformidade do sistema avaliados: número de pratos (N), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As), estão de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas vigentes e foram obtidos satisfatoriamente. Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos dos parâmetros para verificação da conformidade do sistema cromatográfico.

Tabela 13 - Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico

Sulfonamidas	t _R	N	k	Rs ^(*)	As
SDZ	8,45	8002,23	1,6	3,0	1,04
STZ	10,33	8710,16	2,8	6,74	1,25
SMZ	15,24	12014,63	3,4	8,44	1,20
SDM	22,09	26853,47	4,0	11,41	1,00

t_R – tempo de retenção das sulfonamidas; N – número de pratos teóricos; k – fator de retenção; Rs – resolução; As – fator de assimetria

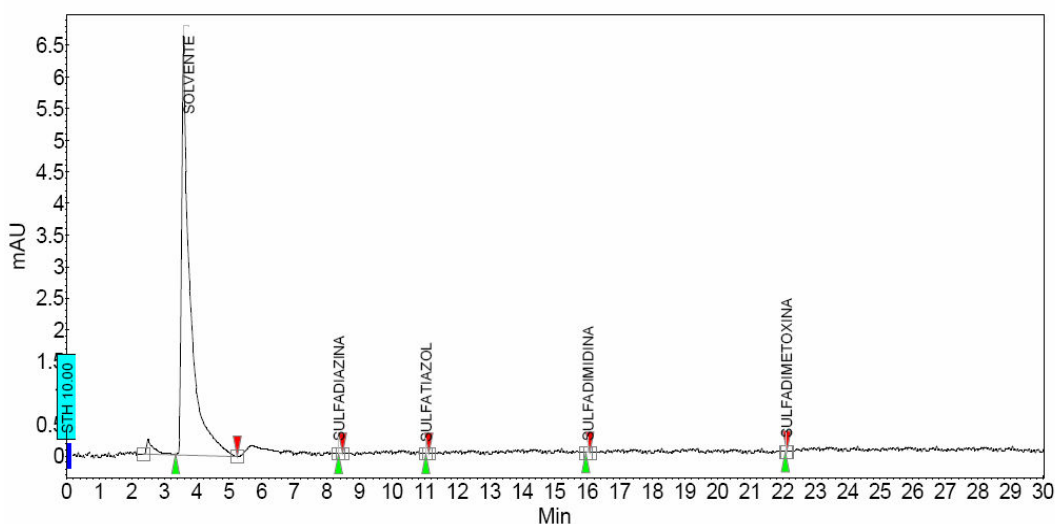
(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes.

Considerando-se as condições citadas por SHABIR [113]: $1 \leq k \leq 10$; $Rs > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

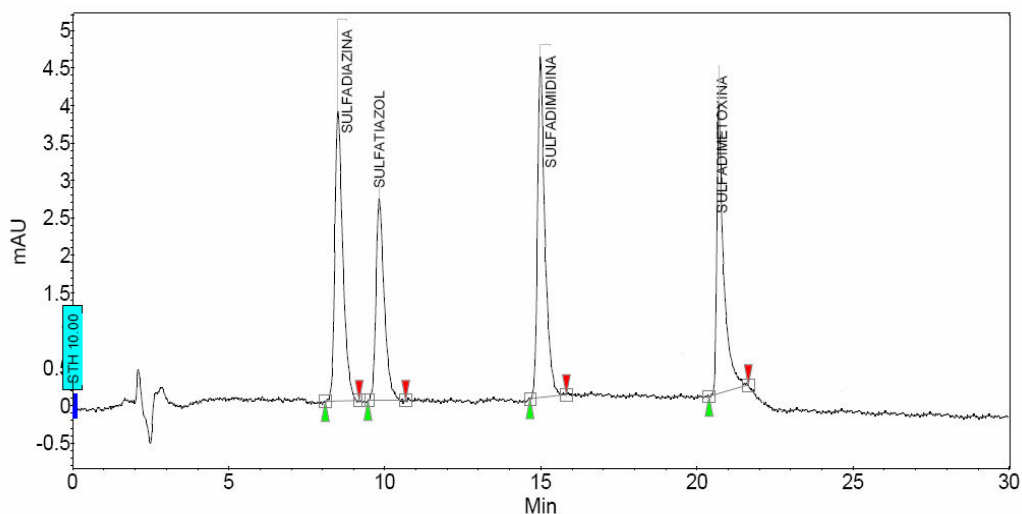
6.6.2 Seletividade

O estudo da seletividade do método teve como objetivo quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no mel. A seletividade foi testada analisando-se o extrato da amostra testemunha (extrato contendo só mel) e o extrato da amostra testemunha fortificado com as sulfonamidas (extrato contendo mel fortificado com as sulfonamidas).

No extrato da amostra testemunha não foram observados picos interferentes referentes aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, durante toda a separação cromatográfica. Foram observados apenas sinais característicos do solvente. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28 - a e b.



(a)



(b)

Figura 28 - Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.

Segundo a ANVISA não são recomendados que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito sejam superiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Como verificado na Figura 31, não existem picos interferentes, conclui-se, portanto, que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

6.6.3 Curva analítica

Foram construídas curvas analíticas, com soluções-padrão. As curvas analíticas com os padrões foram feitas com cinco injeções sucessivas (em quintuplicata), de cada ponto das curvas (25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$), sempre da menor para a maior concentração, sendo utilizada a média das leituras para a construção das curvas.

As curvas foram construídas plotando-se a área do pico *versus* a concentração do analito (Figura 29), onde y é a resposta em unidades de área e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

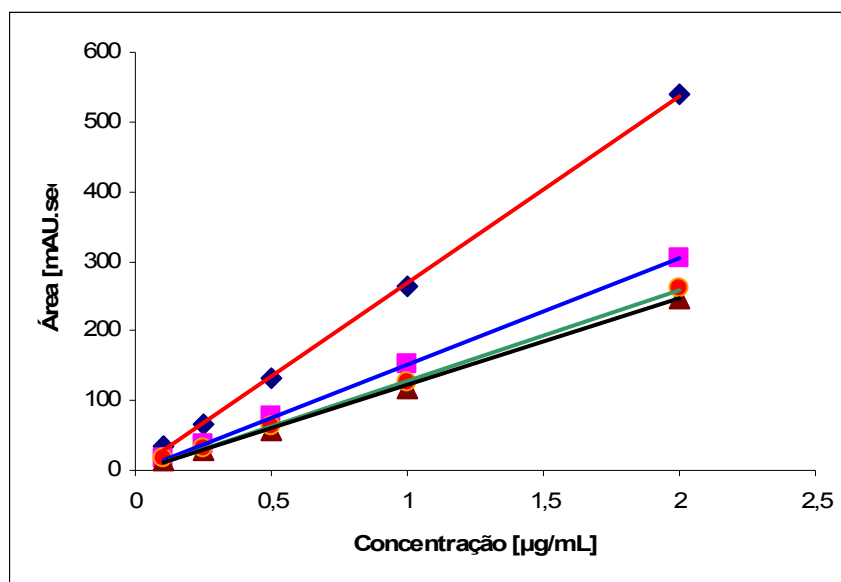


Figura 29 – Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).

Os valores das leituras foram submetidos a tratamentos estatísticos para obtenção dos coeficientes de correlação (r^2) e as equações das retas de cada sulfonamida pela extrapolação dos dados com o uso do *software Origin 6.0* e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão

Sulfa	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação de regressão	Coeficiente de correlação (r^2)
SDZ	0,025-2,0	$3,5754x - 0,021$	0.9990
STZ	0,025-2,0	$2,9936x - 0,043$	0.9996
SDD	0,025-2,0	$2,3462x - 0,019$	0.9994
SDM	0,025-2,0	$2,2321x - 0,063$	0.9983

Os coeficientes de correlação encontrados, todos superiores a 0,9900, demonstraram que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração estudado. Os resultados encontrados estão de acordo com as recomendações da ANVISA [58] para a validação de métodos analíticos.

6.6.4 Faixa linear, linearidade, sensibilidade

Para todo método existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,9900. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

A linearidade da resposta foi determinada através da habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear.

A sensibilidade foi estudada como a resposta do detector em função da concentração do analito, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

6.6.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das soluções-padrão das sulfonamidas em concentração decrescentes. Os limites de

detecção e quantificação foram calculados através das relações sinal/ruído. Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação.

6.6.6 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g⁻¹). O nível de fortificação utilizado nesta pesquisa baseou-se no LMR estabelecido pelo PNCR, do MAPA.

Tabela 15 - Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SDM
Faixa linear (µg mL ⁻¹)	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0
Sensibilidade (µau mL µg ⁻¹)	-0,021	- 0,043	-0,019	-0,063
Linearidade (r ²)	0.9990	0.9996	0.9994	0.9983
Precisão intra-ensaio (%RSD) n=5	2,84	5,24	4,31	3,01
Precisão inter-ensaio (%RSD) n=5				
25 ng g ⁻¹	12,99	11,11	12,65	10,81
50 ng g ⁻¹	5,81	8,64	7,14	6,02
100 ng g ⁻¹	3,41	4,88	3,49	3,57
LD (ng mL ⁻¹)	20	25	30	30
LQ (ng mL ⁻¹)	66	75	90	90

6.6.6.1 Precisão

Segundo o INMETRO [95] a precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Nesta pesquisa a precisão intra-ensaio foi avaliada mediante a análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, de duas amostras de mel fortificadas até a concentração de 100 ng g^{-1} . O RSD para todas as sulfonamidas ficou na faixa de 2,84 a 5,81% (Tabela 15). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de mel fortificadas em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}) em três dias diferentes, em quintuplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todas as sulfonamidas foi na faixa de 3,41 a 12,99% (Tabela 15).

Para a ANVISA [58] os intervalos de desvio padrão relativo (RSD) são considerados adequados se valores até 20% forem encontrados. Como todos os valores de RSD mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto pode ser considerado preciso.

6.6.6.2 Exatidão

A exatidão é medida com relação ao quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra [104], representado pelos valores das recuperações.

Foram realizados dois testes de recuperação, um utilizando apenas um nível de fortificação (100 ng g^{-1}) e um outro utilizando três níveis de fortificação (25, 50 e 100 ng g^{-1}). Para os testes de recuperação realizados em um mesmo dia, mesmo equipamento e mesmo analista, as recuperações variaram na faixa de 83 a 89,3%, estes resultados se encontram de acordo com os valores estipulados pela ANVISA [58], confirmando a exatidão do método.

As recuperações médias das sulfonamidas nos três níveis de fortificação avaliados de 74 a 88 %. Os menores valores de recuperação foram obtidos para o menor nível de fortificação, 25 ng g^{-1} , sendo de 72% e, proporcionalmente, a melhor recuperação foi encontrada para o maior nível de fortificação, 100 ng g^{-1} (88%). Dentre as quatro sulfonamidas estudadas, a sulfadiazina foi a que apresentou os melhores resultados em todos os níveis de fortificação (77, 86 e 88%, respectivamente).

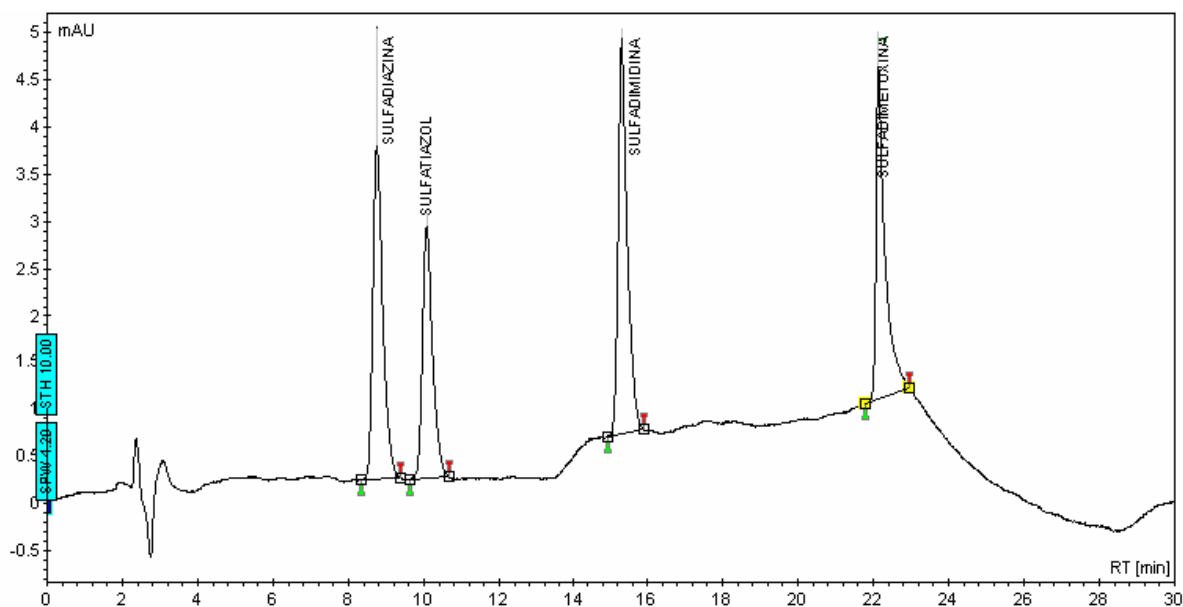


Figura 30 - Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹.

Os valores das recuperações das sulfonamidas obtidos nos três níveis ensaiados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.

Sulfa	Nível (ng g ⁻¹)	RM (%)	t _{calc}
SDZ	25	77	-1,05
	50	86	-1,40
	100	88	-2,00
STZ	25	72	-1,64
	50	81	-1,05
	100	82	-2,25
SDD	25	79	-1,05
	50	84	-1,14
	100	86	-2,33
SDM	25	74	-1,62
	50	82	-1,80
	100	84	-2,67

RM (%)= média das recuperações; t_{calc}= teste “t” de *Student* calculado

6.6.6.3 Avaliação estatística do método

Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student de significância. Na Tabela 16 são apresentados os resultados com as médias das recuperações percentuais relativas (RM%) obtidas para 5 (n-1) repetições e o t calculado para 95% do intervalo de confiança ($t_{95\%}$) do método aplicado.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados menores que o valor tabelado, $t_{tab}=2,78$, (Quadro 02 – ANEXO 2). Deste modo, aparentemente não existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), podendo-se considerar o método exato.

6.7 ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

O método proposto após ser desenvolvido e validado, foi utilizado para estimar a concentração das quatro sulfonamidas de interesse nesta pesquisa em amostras comerciais de mel provenientes do Estado do Maranhão e de estados vizinhos como o Piauí e Tocantins. Todas as amostras foram coletas no período de setembro de 2007 a março de 2008. Na Tabela 17 são apresentados o número de amostras, as cidades de coleta e suas respectivas codificações.

O objetivo destas análises foi aplicar o método desenvolvido, não realizando, portanto, um controle de qualidade mais completo nas amostras utilizadas, para o qual seriam necessárias mais amostras e aplicação de procedimentos de amostragem e coleta específicos para tal fim.

Tabela 17 – Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.

Estado	Cidade	Nº de amostras	Código
Maranhão	São Luís	01	MA1
	Santa Luzia do Paruá	01	MA2
Piauí	Teresina	01	PI
Tocantins	Paraíso	01	TO1
	Barrolândia	01	TO2

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da aplicação do método nas amostras de comerciais de mel.

Tabela 18 – Análise das amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.

Composto	Quantidade média (ng g ⁻¹) em amostras de mel, n=3				
	MA1	MA2	PI	TO1	TO2
SDZ	nd*	nd	nd	nd	nd
STZ	nd	nd	nd	nd	nd
SDD	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado, aplicando o LD de 20 ng g⁻¹ e LMR de 100 ng g⁻¹.

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os cromatogramas das amostras de méis de Santa Luzia do Paruá, São Luís, Tocantins e Piauí analisadas utilizando-se o método proposto.

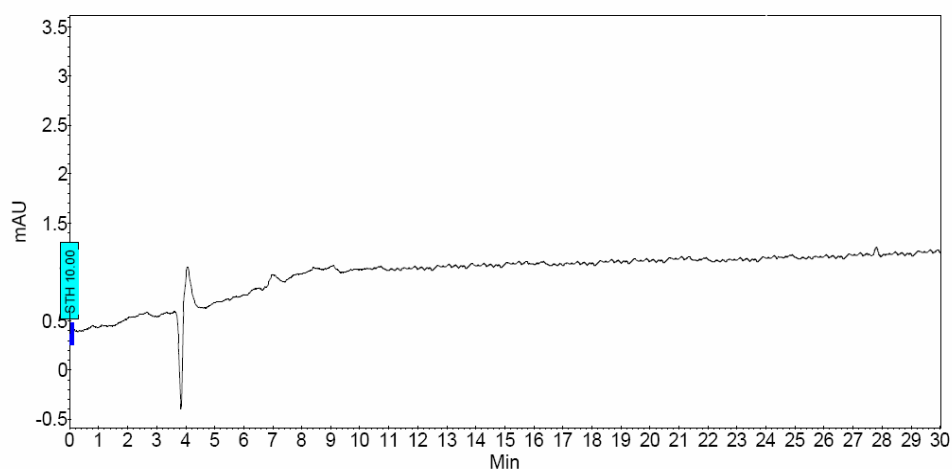


Figura 31 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá.

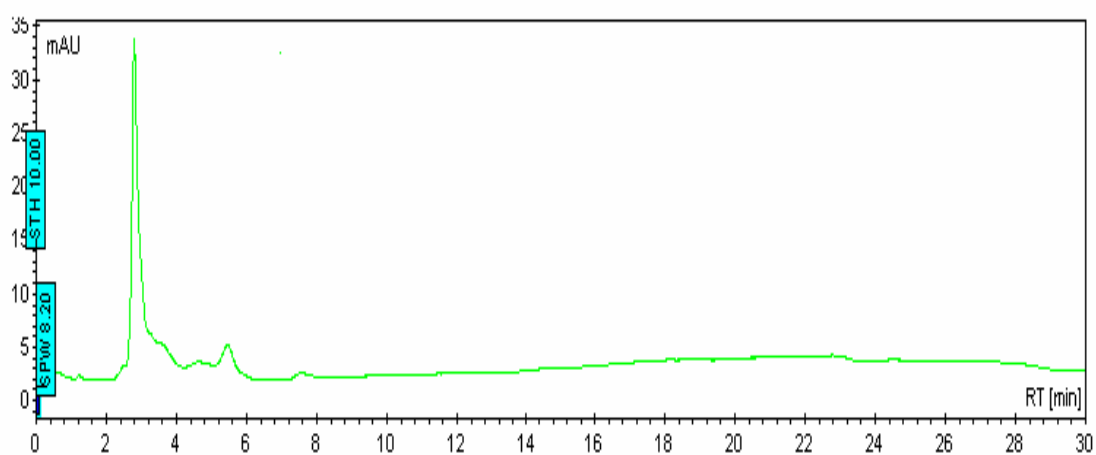


Figura 32 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.

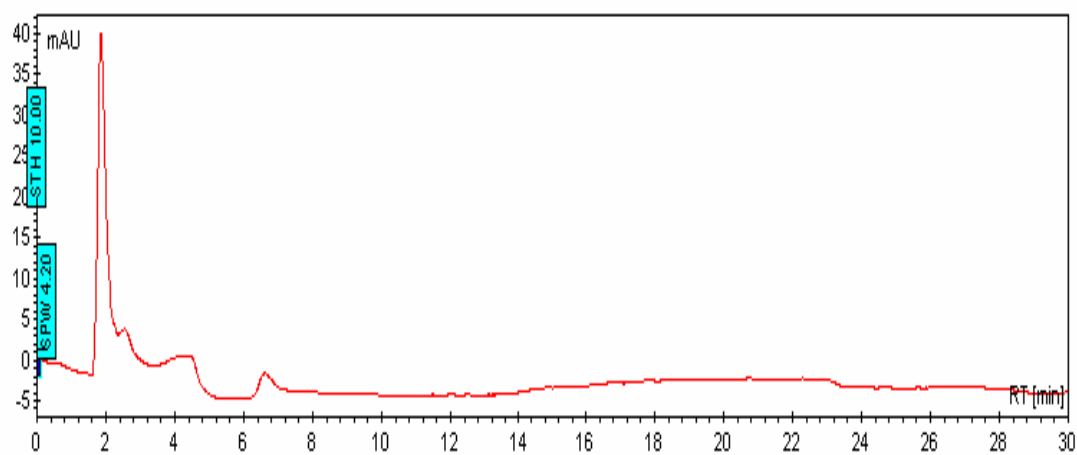


Figura 33 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins

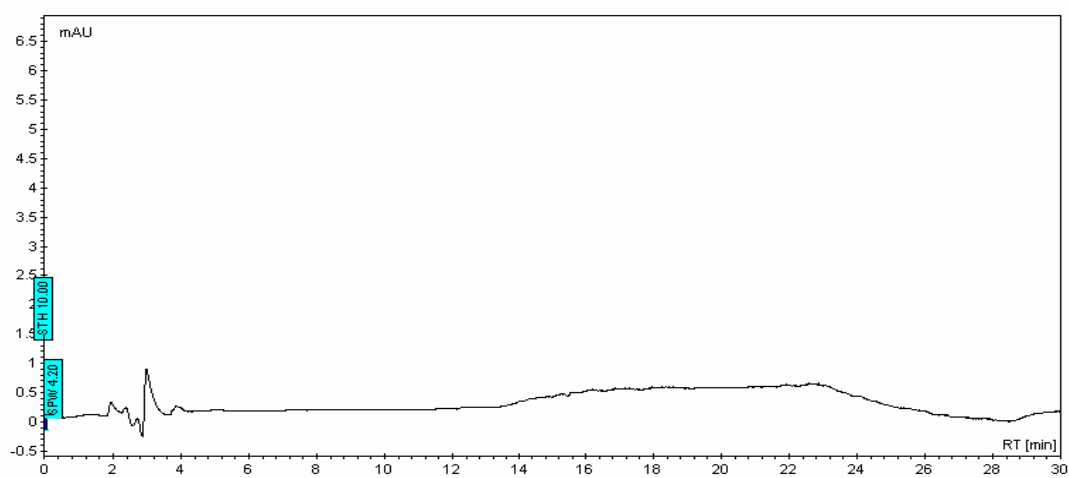


Figura 34 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí

Verifica-se pelas Figuras 31, 32, 33 e 34 que não há presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, indicando que as amostras estão livres de contaminação por resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina. Também não foram verificados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas nas outras amostras comerciais de mel estudadas.

7. CONCLUSÕES



7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel. O procedimento proposto foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato nas condições estabelecidas. Considerando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sulfonamidas ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), os limites de detecção e quantificação do CLAE-DAD apresentaram-se adequados para a análise de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel foi o preparo da amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realizou a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes.

A parte do trabalho relacionada aos estudos de pré-tratamento da amostra, ou seja, a etapa de hidrólise ácida mostrou-se eficiente para a redução do número de interferentes.

Os estudos de recuperação mostraram que para a extração de sulfonamidas em mel os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos Nexus. Foram realizados testes de recuperações em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}). As recuperações médias obtidas após otimização do método variaram de 72 a 88%, e os coeficientes de variação variaram de 2,84 a 12,99%.

Foi verificado que as amostras de mel coletadas e analisadas não apresentaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina, fato este que serve como indício da qualidade do mel produzido na Região Norte e Nordeste.

8. REFERÊNCIAS



8. REFERÊNCIAS

- [1] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000.
- [3] SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia – Relatório Completo**. Série Mercado. 2006.
- [4] PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. **Mel: Câmbio e Embargo Europeu podem prejudicar exportações em 2006**. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.4. abril/2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>> Acesso em: 19 de março de 2007.
- [5] SHIMANUKI, H. Bacteria. In: Flottum, K. (Ed.), **Honey Bee Pests, Predators, and Disease**, third ed. pp. 33–54, Medina, Ohio. 1997.
- [6] SCHWARTZ, D.P.; SHERMA, J.. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.72, 1986.
- [7] SHERMA, J.; BRETSCHNEIDER, W.; DITTAMO, M.; DIBIASE, N.; HUH, D.; SCWARTZ, J.P. **Journal of Chromatography**. v.463, p.229, 1989.
- [8] NEIDERT, E; BARANIAK, Z.; SAUVE, A. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.641, 1986.
- [9] SUN, H.; AI, L.; WANG, F. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. **Chromatographia**, v.66, N. 5/6, p.333-337, setembro, 2007.
- [10] FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M. de S.; SANTOS, J.G.R. dos; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTANA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.80-82, 2007.

- [11] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p.307-311, 2006.
- [12] GALLINA, A.; BENETTI, C.; BIANCOTTO, G.; BAGGIO, A.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; MUTINELLI, F. Antibiotics residues in honey: validation procedure. **APIACTA**, V.40, P.45-49, 2005.
- [13] ZAYAS-BLANCO, F. de; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatography separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, p.375-378, 2004.
- [14] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.
- [15] AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 3531-3539, 1990.
- [16] SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 875-879, 1990.
- [17] GARCÍA, J.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; ALDAMA, J.M. Validation of an analytical method to determine sulfamides in kidney by HPLC-DAD and PARAFAC 2 with first-order derivate chromatograms. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p. 222-234, 2007.
- [18] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European UNION REGULATION 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.23-29, 2004.
- [19] KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxyl/ N^4 -acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues and eggs. **Talanta**, v.67, p.54-58, 2005.

- [20] QUINTANA-RIZZO, J.; SALTER, R.S.; SAUL, S.J. Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin honey. **APIACTA**, V.40, P.55-62, 2005.
- [21] FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. **Chromatographia**, v.57, N. 5/6, p.317-320, 2003.
- [22] HAMMEL, Y.A; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.H.; GUY, P.A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p.58-76, 2008.
- [23] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.
- [24] MOHAMED, R.; HAMMEL, Y.-A.; LeBRETON, M.-H; TABET, J.-C.; JULLIEN, L.; GUY, P.A. Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1160, p.194-205, 2007.
- [25] LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.72, p.1082-1087, 2007.
- [26] KISHIDA, K. Quantitation and confirmatory of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, v.18, p.301-305, 2007.
- [27] BATT, A.L.; SNOW, D.D.; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, p.1963-1971, 2006.

- [28] PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, p.225-232, 2006.
- [29] KERR, W. E. **Papel das abelhas sociais na Amazônia**. Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente. (Florianópolis – SC - Brasil). 119-129. 1979.
- [30] SEBRAE, Apicultura brasileira – Produção Nacional. Disponível em : <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/IBGE.pdf> Acesso: 07 fev. 2008.
- [31] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2003 – 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1 Acesso em 23 ago, 2007.
- [32] SODRÉ, G. da S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA - APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [33] CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985, 226p.
- [34] NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [35] NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/storyhoney.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [36] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.
- [37] CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura - 01).
- [38] HOOPER, T. Guia do apicultor. [S.1]: Publicações Europ-América, p. 223-266, 1976.

- [39] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [40] SHIMANUKI, H., KNOX, D.A. Susceptibility of *Bacillus* larvae to Terramycin. **American Bee Journal**. 134, 125–126. 1994.
- [41] HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., KERSTERS, K., DEVOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N., AND BERKELEY, R. C. W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ahs *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.46, 270–279. 1996.
- [42] ALIPPI, A. M., ALBO, G. N., LENIZ, D., RIVERA, I., ZANELLI, M., AND ROCA, A. E. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control of American foulbrood in honey bees. **J. Apic. Res.** v.38, 149–158. 1999.
- [43] SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**. v.313, 1072–1077. 2006.
- [44] NESTLÉ. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS, Disponível em: www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?download=M3wBPgDB/8ull6Du36WenojQ1NTTjaXZnqWfVpzLhmf> Acesso em: 05 jul. 2007.
- [45] PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- [46] GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.

- [47] FELI, M.A.F. Antibacterianos – Sulfonamidas. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/sulfonamidas2007.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- [48] MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.
- [49] WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 23, n. 4, p.362-384, abril, 2006.
- [50] MERCK, The Merck Index—**An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, Merck, Rahway, NJ, 1989.
- [51] WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.40, ISSUE 7, p. 723-730, abril, 2000.
- [52] MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Campinas-SP, 2007. 197p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. III - Universidade Estadual de Campinas.
- [53] QIANG, Z.; ADAMS, C. Potenciometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**. v.38, ISSUE 7, p.723-730, abril, 2000.
- [54] COMBS, M.T.; KHORASSANI, M.A.; TAYLOR, L.T. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight sulfonamides. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p.301-308, 1999.
- [55] O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 297-319, 1998.

[56] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[57] BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999. Disponível em: <

www.dgv.min-agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório%202006%20divulgação.pdf

> Acesso em: 22 de março de 2007.

[58] ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.

[59] DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. **In: Antimicrobials in foods**. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.

[60] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLMÍ, C.; CURINI, R. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4614-4624, 2004.

[61] MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid-chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85-92, 2004.

[62] MARTEL, A.-C.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, N. 6, p.953-961, 2003.

[63] 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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p.534-541, 2003.

[64] HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, N. 5, p.786-789, 1992.

- [65] WANG, Z.; ZHANG, S.; DING, S.; EREMIN, S.A.; SHEN, J. Simultaneous determination of sulphamethazine and sulphadiazine in a new monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay. **Food Additives e Contaminants**. v.25, p.574-582, maio, 2008.
- [66] TAMOSUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. Comparison of LC and UPLC Coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. **Chromatographia**. v.67, p. 783-788, set, 2008.
- [67] GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A.M.M.; RABONE, F.; SALERMO, A.G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 116-119, jan, 2008.
- [68] ZOU, Q.-H; WANG, J.; WANG, X.-F; LIU, Y.; HAN, J.; hou, f.; xie, m.-x. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal AOAC International**, v.91, p.252-257, jan, 2008.
- [69] BISWAS, A.K.; RAO, G.S.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MALIK, J.K. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8845-8850, 2007.
- [70] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.
- [71] LAMBA, S.; SANGHI, S.K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.110-115, 2005.
- [72] PANG, G.-F.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; JIA, G.-Q; FAN, C.-L.; LI, X.-M.; LIU, Y.-M.; LI, Z.-Y.; SHI, Y.-Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.88, p.1304-1311, maio, 2005.

- [73] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p.259-264, 2005.
- [74] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSA, J.; SNIEGOCKI, T.; GRZEBALSKA, A. Sulfonamides residues in honey. Control and Development of Analytical Procedure. **APIACTA**, v. 38, p.249-256, 2003.
- [75] REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**, V.38, P.23-30, 2003.
- [76] POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p.111-117, 2002.
- [77] HELLER, D.N.; NGOH, M.A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M.H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.39-52, 2002.
- [78] STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamides residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p.37-42, 2000.
- [79] ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 898, p.95-102, 2000.
- [80] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.

- [81] HEERING, W.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAVER, E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v.123, p.2759-2762, 1998.
- [82] GEHRING, T.A; RUSHING, L.G.; CHURCHWELL, M.I.; DOERGE, D.R.; McERLANE, K.M.; THOMPSON JR, H.C. Determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 44, N. 10, 3164-3169, 1996.
- [83] 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, p.1457-1461, outubro, 1996.
- [84] VIÑAZ, P.; ERROZ, C.L.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescent derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.726, 1995.
- [85] PATHY, M. Trace analysis of sulfaquinoxaline in animal tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Vol. 275, 115-125, 1983.
- [86] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation technique for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.36-53, 2007.
- [87] LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, p.1-35, 2004.
- [88] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.68-76, 2001.
- [89] ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos – SP. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2006.

- [90] TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean up procedures and selective detectors. **Journal Chromatography A**, v.823, p.137-146, 1996.
- [91] QUEIROZ, S. C. N.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- [92] MAJORS, R. E. **LC-CG Supplement**. v.8, *maio*, 1998.
- [93] IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba – PR. p.134. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [94] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. **Química Nova**, v.27, n.5, set./out., 2004.
- [95] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ – CGCRE – 008**, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> Acesso em: 24 maio 2007.
- [96] BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.
- [97] RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. Campinas-SP, 96p. Dissertação (mestrado) - Unicamp, 2004.
- [98] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.
- [99] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. London, 1995. Q2A

(CPMP/ICH/381/95). Disponível em: www.eudra.org/emea.html. Acesso em 11 de fev. 2008.

[100] THOMPSON, M.; ELISSON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure App. Chem.**, v.74, p.835-855, 2002.

[101] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals**. Expert Consultation, 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 11 fev. 2008.

[102] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

[103] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

[104] LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76p.

[105] HUBERT, P. et al The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

[106] USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776- 1777, 1995.

[107] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em 26 de out. 2007.

[108] BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

[109] EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods**. Brussels: EUROPEAN COMMISSION, 2004. SANCO/825/00. rev.7. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf>.

Acesso em: 11 fev. 2008.

[110] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora, 2001.

[111] IBGE, Cidades - Prefeituras e Municípios 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>> Acesso em: 23 maio 2008.

[112] GOOGLE EARTH. Disponível em: <www.google.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

[113] SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

[114] SHETH, H.B.; YAYLAYAN, V.A.; LOW, N.H.; STILES, M.E.; SPORNS, P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1125-1130, 1990.

[115] SCHWAIGER, I.; SCHUCH, R. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.** v. 96, p.93, 2000.

[116] CANCHO-GRANDE, B.; FALCÓN, M.S.G.; COMESAÑA, M.R.; GÁNDARA, J.S. Determination of sulfametazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3145-3150, jun. 2001.

[117] INMETRO - INSTITUTO DE QUALIDADE E METROLOGIA. **Expressão da Incerteza de medição**, Rio de Janeiro, Apostila, 2002.

[118] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidande: validation of chromatographic methods**. Rockville: Center for Drug Evaluation

and Research (CDER), 1994. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf. Acesso em 11 de fev. 2008.

[119] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedural Manual**. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

[120] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; SANTOS, T.C.R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p.155-168, 2002.

[121] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, jul./dez., 1994.

[122] DE AMARANTE Jr; O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, São Luís, v.12, n.1/2, p.116-131, 2001.

[123] LEITE, F. In: **Validação em Análise Química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 4^a ed., 2002.

[124] CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.10.

[125] COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp. Campinas, 170 p., 1998.

[126] MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; DIEZ, M.M.; GARCÍA, M.C.M.; GIL, D.B.; CAÑADA-CAÑADA, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in Money simples. **Talanta**, v.73, p.304-313, 2007.

[127] THOMPSON, T.S.; PERNAL, S.F.; NOOT, D.K.; MELATHOPOULOS, A.P.; VAN DEN HEEVER, J.P. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.304-311, 2007.

- [128] LI, H.; KIJAK, P.J.; TURNIPSEED, S.B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: a multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.836, p.22-38, 2006.
- [129] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p.174-181, 2005.
- [130] THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p.168-176, 2005.
- [131] STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A Multiresidue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. **Analytica Chimica Acta**, v.547, p.262-268, 2005.
- [132] SOTO-CHINCHILA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCIA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)]oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p.60-67, 2005.
- [133] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y.-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8468-8473, setembro, 2005.
- [134] MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.64, p.87-100, 2004.

- [135] CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDERIS, B.M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta**, v.494, p.21-28, 2003.
- [136] FUH, M.R.; CHU, S.Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p.215-221, 2003.
- [137] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separations conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v. 98, p.153-158, 2003.
- [138] CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and eggs. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, N. 3, p.558-566, 2003.
- [139] REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.225-232, 2003.
- [140] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.153-158, 2003.
- [141] RHIJI, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A.; BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.121-133, 2002.
- [142] VERZEGNASSI, L.; SAVOY-PERROUD, M.-C.; STANDLE, R.H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.77-87, 2002.

- [143] FUH, M.-R.S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, p.1127-1139, 2001.
- [144] LINDSEY, M.E.; MEYER, M.; THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.73, N. 19, p.4640-4646, outubro, 2001.
- [145] NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C.; BERNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p.169-177, 2000.
- [146] DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p.1243-1247, 2000.
- [147] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [148] REEVES, V.B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.723, p.127-137, 1999.
- [149] KENNEDY, D.G.; McCRAKEN, R.J.; CANNAN, A.; HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p.77-98, 1998.
- [150] CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M.E.; DIMARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal of Chromatography B**, v. 706, p.269-277, 1998.

- [151] AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.1-40, 1995.
- [152] KRISTLANSEN, G.K.; BROCK, R. Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. **Analytical Chemistry**, v.66, N. 19, p.3253-3258, outubro, 1994.
- [153] NIESSEN, W.M.A.; USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. **Analyst**, v.119, p.2543-2548, dezembro, 1994.
- [154] PORTER, S. Confirmation of sulfonamides residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, v.119, p.2753-2756, 1994.
- [155] SHETH, H.B.; SPORNS, P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.1696-1700, 1991.
- [156] UMAGAT, H.; McGARRY, P.F.; TSCHERNE, R.J. Stability indicating sulfa drug analysis using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, N. 7, p.922-924, 1979.

9. ANEXOS



9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Quadro 01 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel – PNCR/2007.

Grupo	Analito	Matriz	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR/NA* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	Mel	CLAE/UV	25	200	7
	Oxitetraciclina (a)					
	Tetraciclina (a)					
	Sulfatiazol (b)	Mel	CLAE/UV	25	100	15
	Sulfadimetoxina (b)					
	Sulfadiazina					
	Sulfaquinoxalina					
	Sulclorpiridazina	Mel	CL/EM-EM	0,5	1(l)*	30
	Nitrofurazona – SEM					
	Furazolidona – AOZ					
	Furaltadona – AMOZ					
	Nitrofurantoina - AHD					
	Tilosina	Mel	CL/EM-EM	0,5	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	Mel	CG/EM-EM	10	10	15
	Alfa-endosulfan			10	10	
	4,4-DDE			10	10	
	4,4-DDD			10	10	
	4,4 DDT			10	10	
	Dodecacloro			10	10	
	Endrin			10	10	
	Iprodiona			50	50	
	Tetradifona			20	20	
	Captana			50	50	
	Lindane			10	10	

Fonte: BRASIL [57].

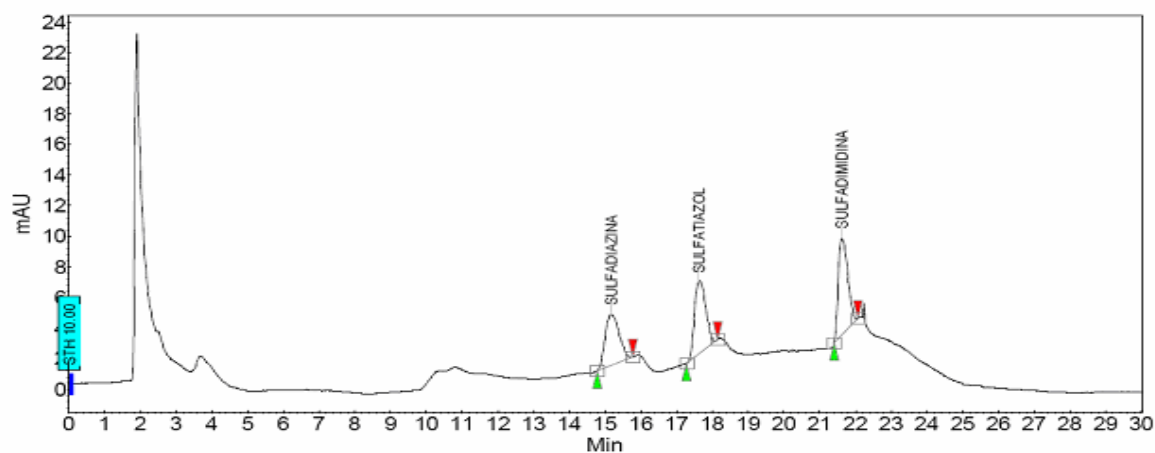
9.2 ANEXO 2

Quadro 02 – Distribuição dos valores do teste “*t*” de Student

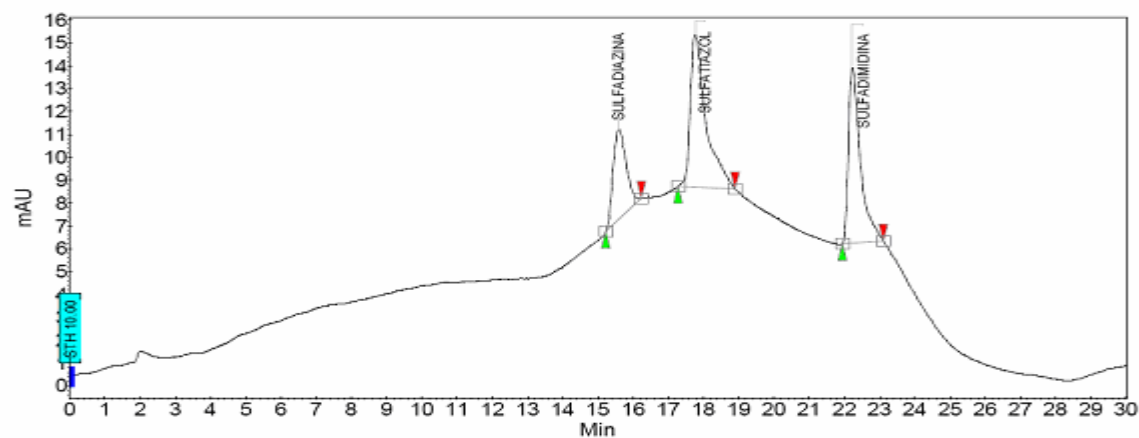
GL (n)	t _{95%}
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086

Fonte: Instituto de Qualidade e Metrologia [2002].

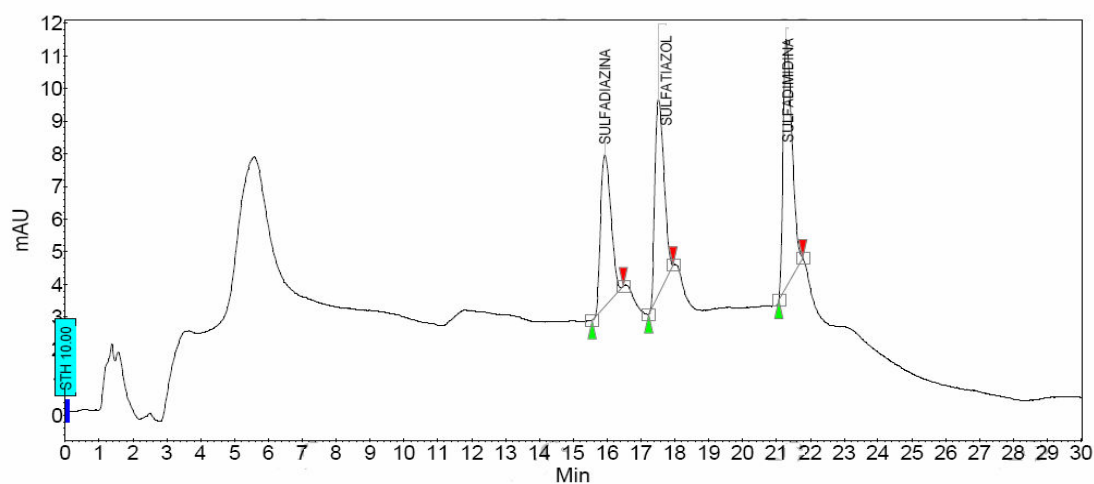
9.3 CROMATOGRAMAS DOS TESTES DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL



(a)

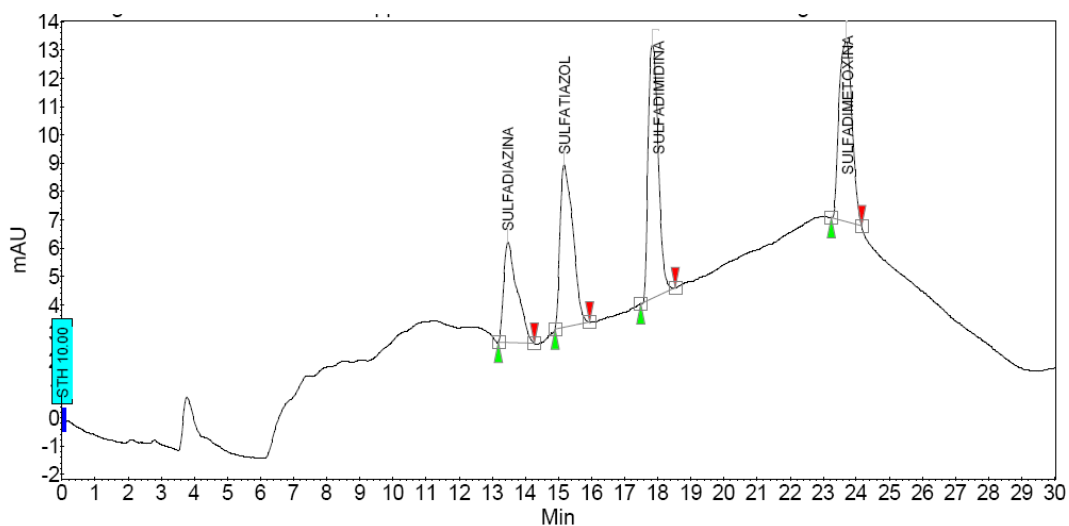


(b)

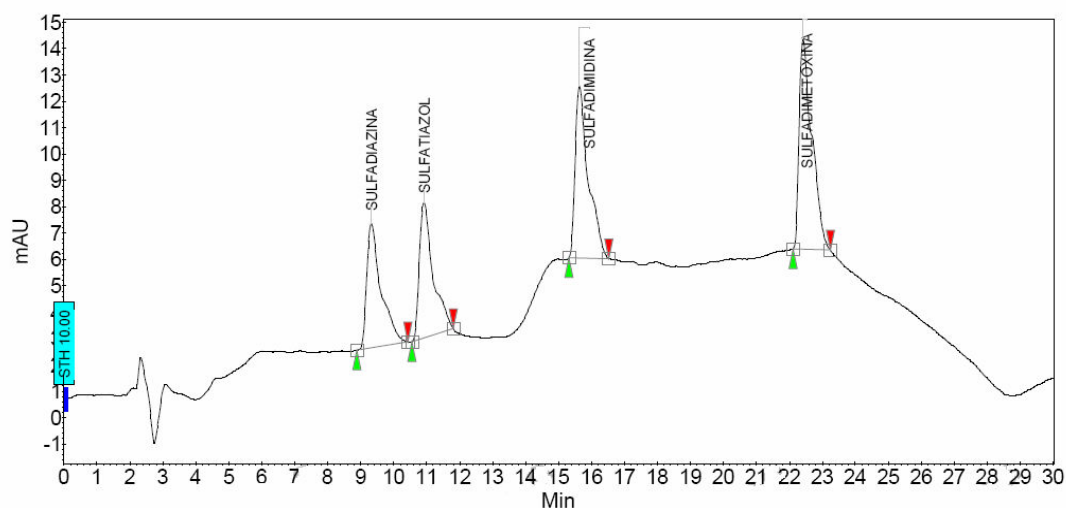


(c)

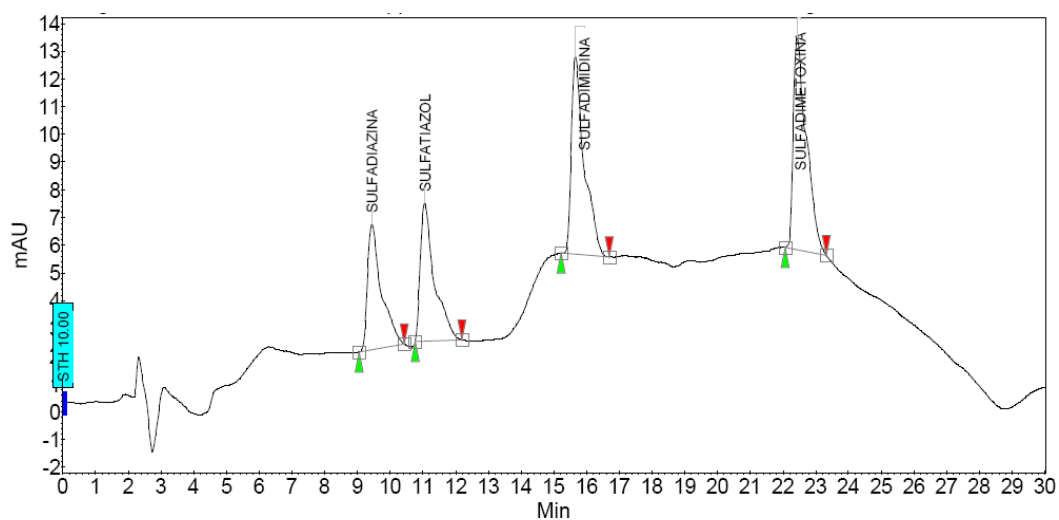
Figura 35 -Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5/Metanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 36 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

São Luís
2008

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco

São Luís
2008

Silva, Verônica Alves Gonçalves da

Desenvolvimento de metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos/ Verônica Alves Gonçalves da Silva. São Luís, 2008.

130f.

Orientador: Teresa Cristina R. dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Química. São Luís, 2008.

1. Mel – resíduos de sulfonamidas. 2. Produção de mel. 3. Extração em fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina R. dos Santos, orient. II. Título.

CDU 658.56:638.14.06

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^ª. Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco
(Orientadora)**

**Prof^º Dr. Laerte da Cunha Azeredo
(DEQUI/UFRRJ)**

**Prof^º Dr. Fernando Carvalho
(DETEQUI/UFMA)**

A Deus e a Nossa Senhora...

Aos meus pais: Maria da Penha Alves da Silva
e Êulete Gonçalves da Silva.

Ao meu amor, Fábio Silveira Vidal.

À minha sobrinha: Iracema D'monik Miranda
Gonçalves da Silva.

E ao meu irmão Fabrício C. G. da Silva.

Por todo amor, carinho e paciência.

E pelo incansável incentivo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos memoráveis, coisas inexplicáveis e pessoas inesquecíveis”.

Ao nosso Deus, Todo Poderoso, meu Mestre, meu Pastor, meu Senhor, por ter me dado coragem para superar todas as dificuldades, por nunca me desamparar!... A Nossa Senhora, que tanto me inspira, em todos os momentos, tirando-me de todas as dificuldades e levando-me a serenidade.

Aos meus pais, que me fornecem a força necessária para tudo na minha vida, por terem me educado tão bem, ensinando-me valores essenciais para ser uma boa pessoa e uma profissional consciente e de muita ética. Agradeço ao meu pai pelo exemplo de pessoa culta e a minha mãe pelo exemplo de professora dedicada. Agradeço também à valiosa lição de sempre me mostrarem que sozinhos não somos nada, mas somos muito mais com a ajuda dos amigos.

Aos meus tios, tia Cida e tio Laerte, por desde cedo me ensinarem a amar a química e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada também por me ensinarem a superar obstáculos estudando.

Ao meu noivo Fábio Silveira Vidal, que tão pacientemente ouviu todas as minhas dúvidas, afagou minhas tristezas, pelo carinho, pelo companheirismo, pelas horas que passou comigo estudando química e pelo seu generoso amor que tanto me incentivou em todas as atividades sempre acreditando que eu iria conseguir.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, por me acolher tão carinhosamente, por seu incentivo durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório NARP pela convivência.

Ao amigo, José Crediciomar pelo apoio, incentivo, paciência (para me ensinar a utilizar o equipamento (HPLC)) e pela grande demonstração de amizade.

Aos meus amigos: Gilvan, Raphael e Álvaro, amigos que fiz e aonde quer que eu vá levarei em meu coração. Agradeço a cumplicidade e agradável convívio, as conversas e os bons momentos compartilhados. Raphael te agradeço mais ainda pela grande ajuda na finalização desta pesquisa, muito obrigada meu amigo!

A querida amiga e bibliotecária, Rosivalda Pereira, pela acolhida fantástica, pelas adoráveis e produtivas conversas na biblioteca do CCET e pela grande ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

A amiga Cláudia Guerra pela convivência, pelo carinho, amizade e por ser minha família em São Luís.

Ao Profº José Wilson pela amizade e orientação profissional, desde a disciplina de catálise continuando seus ensinamentos por todo o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química: Marise e Daniele, aos funcionários do Departamento de Tecnologia Química: Alba, Ivaldo e de outros setores da UFMA, em especial a Dona Eunice e Senhor Alberto, pela constante disposição em me ajudar na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“A pesquisa científica consiste em
ver o que todo mundo já viu, mas
pensar em algo que ninguém pensou
ainda”.*

(Albert Szent-Györgyi)

RESUMO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável, não sendo permitido a presença de aditivos e/ou agentes conservadores. Na apicultura as sulfonamidas são muito utilizadas na prevenção e controle de doenças em colméias, como a cria pútrida americana causada pelo *Paenibacillus larvae*. Uma consequência desta prática é a presença destes resíduos no mel, o que pode causar reações alérgicas nos consumidores. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas no mel. No Brasil, a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A realização de programas de monitoramentos de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando possíveis danos à saúde do consumidor. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico multiresidual para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel de abelhas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A metodologia estabelecida consistiu nas seguintes condições: extração em fase sólida com sorvente Nexus, eluição com 5 mL de acetonitrila e reconstituição com solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, com adição de 1% de metanol, separação em coluna analítica C18, fase móvel acetonitrila e água, no modo de eluição em gradiente e detecção a 278 nm. O preparo de amostra consistiu na hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} de uma alíquota de mel e ajuste para pH 4,5 com solução tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. O método foi validado e os resultados demonstraram exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Foi encontrada boa faixa de linearidade, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 41 a 89% e estimativa do desvio padrão relativo variando entre 2,36 e 14% para os quatro compostos estudados. Os limites de detecção das quatro sulfas em amostra de mel variaram de 20 a $30 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 60 a $90 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para as concentrações totais de SDZ, STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite adequada determinação das quatro sulfas em amostras de mel de abelhas.

Palavras-chave: Sulfonamidas. CLAE-DAD. Extração por fase sólida. Validação. Mel.

ABSTRACT

Honey is a natural substance produced by bees and by your nature it is considered a healthy product. Presence of additives and/or preserve agents is not permitted. On apiculture, sulfonamides are largely used on prevention and control of beehive disease, such as American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. A consequence of this practice is the presence of these residues in honey, that should cause allergy reactions on consumers. In the last years, some published works is discussing the presence of antibiotic and sulfonamides residues in honey. In Brazil, the presence of antibiotics residues in food is controlled by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and by the Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). The realization of monitoring contaminants residues in food programs, as well as the Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) from MAPA are essentials to the sanitary vigilance actions development, preventing and controlling possible hazard to the consumer health. This work has the objective the development and validation of multiresidue analytical method to the sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidine and sulfadimethoxine determination in bee honey using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). The established methodology consisted on such conditions: solid phase extraction with Nexus sorbent, elution with acetonitrile 5 mL, and reconstitution with sodium acetate buffer (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5, with 1% methanol addition, separation on analytical column C18, acetonitrile and water mobile phase, on gradient elution mode and detection on 278 nm. The sample preparation consisted on the acid hydrolysis with hydrochloric acid 2 mol L⁻¹ of a honey rate and adjust to pH 4,5 with sodium acetate buffer solution 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5. The method was validated and the results demonstrated accuracy and precision between the limits established by the current legislation. Good linearity range was encountered, obtaining recovery values varying from 41 to 89% and relative standard deviation estimative varying between 2,36 and 14% to the four studied compounds. The four sulfonamides detection limits in honey sample varying from 20 to 30 µg kg⁻¹ and the quantification limits varied from 60 to 90 µg kg⁻¹. Considering 100 µg kg⁻¹ the residue maximum limit established by the Brazilian legislation to the SDZ, STZ, SMZ and SDM total concentration, the described method permit suitable determination of the four sulfonamides in bee honey.

Keywords: Sulfonamides. HPLC-DAD. Solid phase extraction. Validation. Honey.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 2	Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.....	45
Quadro 3	Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.....	49
Quadro 4	Testes para seleção da composição da fase móvel.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição típica do mel.....	24
Tabela 2-	Propriedades gerais das sulfonamidas.....	27
Tabela 3-	Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.....	38
Tabela 4-	Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.....	64
Tabela 5-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	67
Tabela 6-	Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.....	74
Tabela 7-	Estudo da composição da fase móvel.....	80
Tabela 8-	Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.....	83
Tabela 9-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	87
Tabela 10-	Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)....	90
Tabela 11-	Resultados dos testes de eficiência de extração.....	91
Tabela 12-	Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.....	93
Tabela 13-	Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 14-	Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão.....	97
Tabela 15-	Parâmetros de validação para o método desenvolvido.....	98
Tabela 16-	Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.....	100
Tabela 17-	Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.....	102
Tabela 18-	Análise de amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de mel no Brasil.....	23
Figura 2	Diferentes tipos de mel.....	24
Figura 3	Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas: (a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.....	26
Figura 4	Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida)...	27
Figura 5	Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.....	28
Figura 6	(a) Esquema de cartucho para EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.....	44
Figura 7	Principais etapas empregadas EFS.....	45
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.....	50
Figura 9	Processo de fortificação das amostras.....	54
Figura 10	Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.....	59
Figura 11	(a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.....	60
Figura 12	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.....	63
Figura 13	Procedimentos experimentais empregados nas etapas de extração EFS.....	69
Figura 14	Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.....	72
Figura 15	Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.....	75
Figura 16	Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatógrafo: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm.....	76
Figura 17	Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, 1,0 mg L ⁻¹ , usando C ₁₈ (cromatograma vermelho), C ₈ (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).....	77
Figura 18	Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto).....	78
Figura 19	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água.....	81

Figura 20	Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,5.....	82
Figura 21	Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L ⁻¹	84
Figura 22	Estudo da degradação das soluções-padrão.....	84
Figura 23	Esquema da reação açúcar-sulfonamida.....	86
Figura 24	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , sem hidrólise ácida.	88
Figura 25	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , com hidrólise ácida.	89
Figura 26	Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de <i>clean-up</i>	92
Figura 27	Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹	93
Figura 28	Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.....	95
Figura 29	Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).....	96
Figura 30	Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de 100 ng g ⁻¹	100
Figura 31	Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá	102
Figura 32	Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.....	103
Figura 33	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins.....	103
Figura 34	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí.....	103
Figura 35	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L ⁻¹) pH 4,5/Metanol.....	129
Figura 36	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
C8	Fase estacionária do tipo octilsilano
CODEX	<i>Codex Alimentarius</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido com detector por arranjo de fotodiodos
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
CL	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida - EFS)
t _R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Detector por absorbância no ultravioleta-visível

LISTA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
STZ	Sulfatiazol
SAD	Sulfanilamide
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SID	Sulfisomidina
SMTX	Sulfametoxazol
SDM	Sulfadimetoxina
SBM	Sulfabenzamida
SDX	Sulfadoxina
SQX	Sulfaquinoxalina
SME	Sulfameter
SMX	Sulfamoxol
SMP	Sulfametoxipiridazina
SCP	Sulfacloropiridazina
SSZ	Sulfasalazina
SMDZ	Sulfametoxidiazina
SMTT	Sulfametiltiazol
SMM	Sulfamonometoxina
SAI	Sulfisoxazol
SCT	Sulfacetamida
SGN	Sulfaguanidina
SMT	Sulfametizol
STR	Estreptomicina
DHS	Diidroestreptomicina
CAP	Cloranfenicol
OTC	Oxitetraciclina
AMP	Ampicilina
TC	Tetraciclina
DMC	Democlociclina
CTC	Clorotetraciclina
NEO	Neomicina
PENG	Penicilina G
SPI	Espiramicina
DC	Doxiciclina
PEN	Penetamato
DES	Desmicosina
OLE	Oleandomicina
TIL	Tilmicosina
TYL	Tilosina
OXA	Oxacilina
EA	Eritromicina
CLOX	Cloxacilina
NAF	Naficilina
DIC	Dicloxacilina
ROXI	Roxitromicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µ	Micron
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	Minuto
sec	Segundo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
R ²	Coefficiente de Determinação ou de Correlação Múltipla ou Eficiência da Regressão
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Amostral
t	t de <i>Student</i>
$\bar{X}$	Média aritmética
x _i	Valor Medido
Σ	Somatório
√	Raiz quadrada
σ	Desvio padrão da população

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	22
1.1.1	Características físico-químicas do mel.....	23
1.1.2	Doenças nas abelhas e na colméia.....	25
1.2	SULFONAMIDAS.....	26
1.2.1	Resíduos de sulfonamidas no mel.....	29
1.2.2	Aspectos da legislação.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS.....	35
3.1	PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	43
3.1.1	Extração por Fase Sólida (EFS).....	43
4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.1	FAIXA DE APLICAÇÃO.....	49
4.2	LINEARIDADE.....	51
4.3	SELETIVIDADE.....	51
4.4	PRECISÃO.....	52
4.4.1	Repetitividade.....	52
4.4.2	Precisão intermediária.....	53
4.4.3	Reprodutibilidade.....	53
4.5	EXATIDÃO.....	53
4.5.1	Recuperação.....	54
4.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	55
4.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	56
5.	MATERIAIS E MÉTODO.....	58
5.1	METODOLOGIA.....	58
5.1.1	Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas.....	58
5.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	60

5.2.1	Padrões.....	60
5.2.2	Reagentes e Solventes.....	60
5.2.3	Dispositivos para Extração por Fase Sólida.....	60
5.2.4	Coluna Cromatográfica.....	61
5.2.5	Equipamentos.....	61
5.2.6	Outros materiais.....	62
5.3	MÉTODO.....	62
5.3.1	Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas.....	63
5.3.1.1	Seleção da coluna.....	64
5.3.1.2	Linha de Base do Solvente.....	64
5.3.1.3	Conformidade do Sistema.....	64
5.3.1.4	Seleção do Comprimento de onda.....	65
5.3.1.5	Seleção da fase móvel.....	65
5.3.1.6	Preparação dos padrões.....	65
5.3.2	Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração.....	66
5.3.2.1	Pré-tratamento da amostra.....	66
5.3.2.2	Seleção do adsorvente.....	67
5.3.2.3	Condicionamento dos cartuchos.....	67
5.3.2.4	Eluição dos analitos.....	68
5.3.2.5	Extração por EFS.....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	69
5.4.1	Seletividade.....	70
5.4.2	Linearidade.....	70
5.4.3	Limites de Detecção e de Quantificação.....	70
5.4.4	Estudo de recuperação.....	71
5.4.4.1	Precisão.....	71
5.4.4.2	Exatidão.....	71
5.5	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1	SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	74
6.2	SELEÇÃO DA COLUNA.....	77
6.3	SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	77
6.3.1	Seleção do pH da fase móvel.....	78

6.3.2	Composição da fase móvel.....	79
6.3.3	Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho.....	82
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	83
6.5	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS.....	85
6.5.1	Pré-tratamento da amostra.....	85
6.5.2	Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração em fase sólida.....	90
6.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	94
6.6.1	Conformidade do sistema.....	94
6.6.2	Seletividade.....	95
6.6.3	Curva analítica.....	96
6.6.4	Faixa linear, linearidade, sensibilidade.....	97
6.6.5	Limites de detecção e quantificação.....	97
6.6.6	Precisão e Exatidão.....	98
6.6.6.1	Precisão.....	98
6.6.6.2	Exatidão.....	99
6.6.6.3	Avaliação estatística do método.....	101
6.7	ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	101
7.	CONCLUSÃO.....	106
8.	REFERÊNCIAS.....	108
9.	ANEXOS.....	127
9.1	ANEXO 1.....	127
9.2	ANEXO 2.....	128
9.3	ANEXO 3.....	129

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável. A adição de aditivos e agentes conservadores no mel não é permitida. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas em mel. Antibióticos são principalmente usados na apicultura para o tratamento de doenças bacterianas ou outros tipos de doenças infecciosas [1].

Para aceitação do produto apícola, no Brasil, é necessário que o produto obedeça ao regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A legislação vigente é descrita na Instrução Normativa N. 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [2]. A citada norma define tipos de mel, procedimento de obtenção, apresentação e/ou processamento, além de estabelecer limites para os dez principais parâmetros físico-químicos, importantes na avaliação da pureza, maturidade e possível adulteração do mel.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro no mercado externo, é necessário que o produto cumpra as exigências estabelecidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), mais especificamente do Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM [3]. O programa visa atender às exigências do mercado externo, em especial da Comunidade Européia, responsável por mais de 90% da exportação de mel brasileiro e estabelece, dentre outras coisas, a avaliação quanto à presença de resíduos no produto, o potencial da utilização inadequada de drogas no produto e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas. Várias classes de substâncias tóxicas são incluídas neste programa, mais especificamente organoclorados, antibióticos, metais pesados, substâncias promotoras de crescimento, tireostáticos e sulfonamidas.

A ausência de controle de resíduos no mel brasileiro foi a principal justificativa para o embargo ocorrido em 2006 na União Européia [4]. Uma das grandes preocupações do mercado apícola atual é a eliminação total de resíduos de antibióticos e defensivos agrícolas no mel. Utilizados para prevenir e tratar enfermidades nas abelhas e doenças de origem bacteriana na colméia fora da época de florada, os antibióticos, se utilizados sem o devido controle, podem causar prejuízos a qualidade do mel. A restrição do comércio internacional baseia-se no fato de que tais substâncias poderiam atingir o consumidor, que estaria ingerindo o mel contaminado, acarretando danos à sua saúde, tais como, adaptação e resistência de

bactérias no organismo. Por este motivo é que, recentemente, alguns países compradores de mel têm incluído em suas exigências um produto apícola livre de antibióticos.

Embora o uso de antibióticos em colméias seja uma prática constante dos apicultores, o Brasil possui um grande diferencial no contexto mundial, visto que existem poucos registros de doenças comuns em abelhas, principalmente na região Nordeste.

Sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, na apicultura, são utilizadas no tratamento e prevenção da “cria pútrida” em abelhas, doença provocada pelo *Paenobacillus larvae*. Uma consequência direta do uso é a ocorrência de resíduos de sulfonamidas no mel de abelhas, o que compromete a qualidade do produto [5].

Estudos para estes compostos incluem procedimentos colorimétricos como a reação de Bratton-Marshall [6;7]; cromatografia em camada delgada (CCD) [8], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) [9, 10; 11; 12; 13; 14; 15 e 16, dentre outros], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) [17; 18; 19; 20 e 21, dentre outros] espectrometria de massas no modo “tandem” (CLAE-EM ou CLAE-EM/EM) [22; 23; 24; 25; 26; 27 e 28, dentre outros].

A literatura atualmente disponível para análise de sulfonamidas em mel ressalta a especificidade da matriz com relação à aplicação de métodos analíticos. No Brasil, existem poucos trabalhos com sulfonamidas em mel. A disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos apícolas, quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, é essencial para fornecer aos apicultores garantias sobre a qualidade de seu produto, garantindo-lhes condições de exportar. Pelo exposto é que veio o interesse em fazer esta pesquisa. Este trabalho também poderá ser utilizado como um incentivo na realização de novos estudos envolvendo sulfonamidas em alimentos (matrizes diferentes de mel).

1.1 MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS

O Brasil tem um grande potencial apícola, devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variedade edafoclimática existente, o que possibilita produzir mel o ano todo [29]. A apicultura é uma atividade que se enquadra no tripé da sustentabilidade podendo favorecer programas de desenvolvimento econômico, social e ecológico como os existentes no Nordeste brasileiro. Em 2004 o Brasil alcançou a posição

de 11º produtor mundial de mel (40 mil toneladas) e o 5º exportador mundial (21 mil toneladas). No cenário mundial, os principais produtores de mel são China, Estados Unidos e Argentina e os maiores exportadores são China, Argentina, México e Alemanha. No Mercosul, o Brasil é superado apenas pela Argentina. A produtividade brasileira ainda é baixa [3].

Dos produtos apícolas o mel é o que tem maior destaque para o comércio. A região Sul é a principal região produtora de mel no país com 47,72%. A região Nordeste vem na segunda posição com 31,58% da produção, seguida das regiões Sudeste (16,22%), Centro-Oeste (2,87%) e Norte (1,62%) [3].

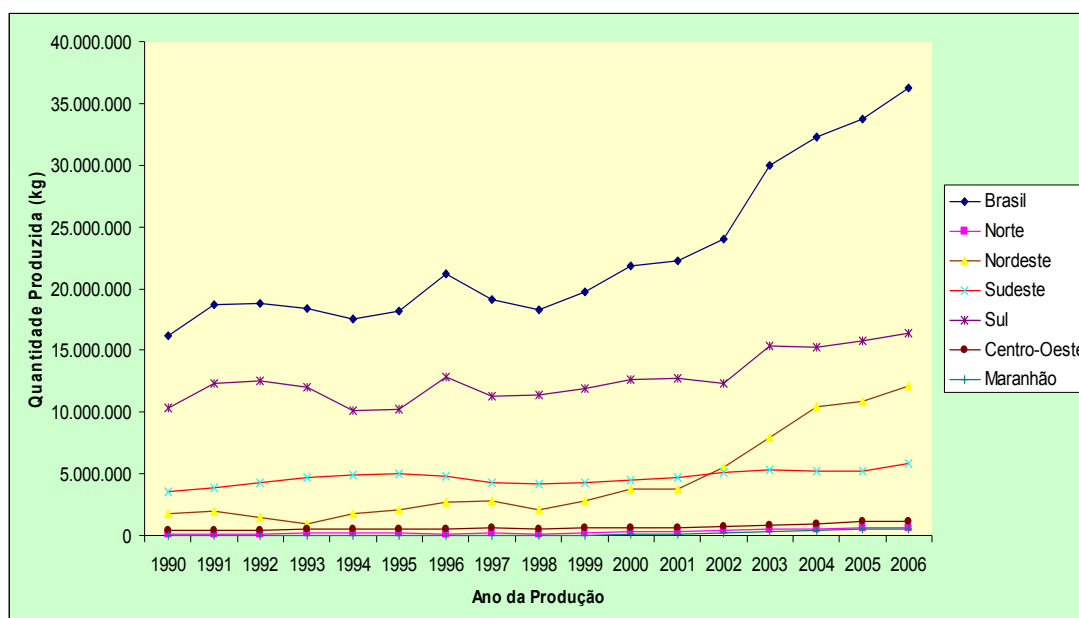


Figura 1 – Produção de mel no Brasil.

Fonte: adaptado de [30]

Segundo dados do IBGE [31] o Maranhão, no ano de 2005, passou a ocupar a 10ª posição no *ranking* nacional, tendo alcançado um aumento de produção de 289 % em relação à estatísticas realizadas pelo mesmo órgão no ano de 2001, comprovando-se o grande potencial de produção do estado.

1.1.1 Características físico-químicas do mel

O mel (Figura 2) é um produto biológico muito complexo, devido a sua composição variar com a flora e ser influenciado pelas condições climáticas e edafológicas da

região onde foi produzido [32]. Segundo Crane [33] mel é o resultado da desidratação e transformação do néctar, portanto a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar.



Figura 2- Diferentes tipos de mel.

Fonte: Internet: [34]

A composição físico-química do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais também estão diretamente relacionados com a fonte do néctar que o originou e assim como com a espécie da abelha que o produziu [32]. A Tabela 1 apresenta uma visão geral da composição química do mel.

Tabela 1 - Composição típica do mel.

Componente	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76-1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 -40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020-1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	----
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68-59,49	10,33
Proteína (%)	0,1686	0,0577-0,567	7,09

Fonte: NATIONAL HONEY BOARD [35].

Sabor e aroma. O sabor e aroma característicos do mel são conferidos pela presença dos compostos voláteis. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado

diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-los dos favos [36]. Os aromas podem ser classificados em característico, adocicado, floral, cera e queimado. Já o sabor pode ser classificado como característico, adocicado, floral, cera, queimado, ácido e residual.

Cor. “A coloração do mel” é normalmente interpretada como algo mais escuro que creme e mais claro que marrom. A cor do mel líquido pode realmente variar de branco-aquoso a próximo de preto, com variantes tendendo para matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul [33].

Água. O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% [37]. Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. A quantidade de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade [32].

Açúcares. O poder adoçante do mel é avaliado em cerca da metade do atribuído ao mesmo peso de açúcar de cana [33]. Além da doçura, os açúcares são responsáveis por outras características, tais como: capacidade de conservação, poder higroscópico e habilidade de promover cor e sabor [38]. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5% a 40% para a glicose e de 36,2% a 49,6% para a frutose, de acordo com a florada [39].

Diversos. Outros componentes importantes presentes no mel são as enzimas, os aminoácidos, os ácidos orgânicos e minerais.

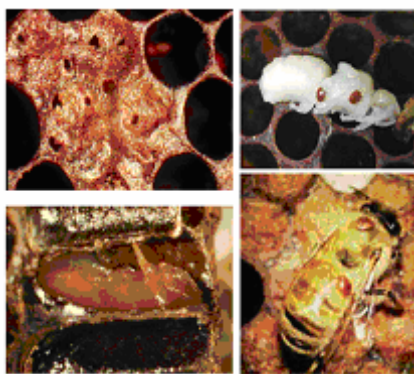
1.1.2 Doenças nas abelhas e na colméia

Assim como em seres humanos as abelhas são susceptíveis a numerosas enfermidades, necessitando de tratamentos adequados à base de fármacos como as sulfonamidas para prevenção e/ou tratamento destas. Na Figura 3 são apresentadas as doenças que mais afetam abelhas e colméias. Dentre as enfermidades que mais as afetam está a cria pútrida.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (*American Foulbrood*), é produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas [40; 41]. O tratamento ocorre pela administração dos antibióticos na água ou através de alimentação artificial contendo a medicação, geralmente administrada, antes da florada [42].

Este tipo de doença quando acontece é capaz de dizimar dezenas de colméias, sendo uma enfermidade muito temida pelos apicultores.

O Brasil tem se destacado no cenário internacional por ter praticamente erradicado esta doença. A grande questão que envolve doenças na apicultura, assim como em outras atividades produtoras de alimentos, é a utilização de fármacos na prevenção ou tratamento destas. As sulfonamidas são compostos que podem ter sua ação prolongada por muito tempo dependendo do tipo de matriz a qual ela está presente [43]. O uso inadequado de fármacos na prevenção ou controle de doenças na colméia pode acarretar danos a qualidade do produto e causar problemas na saúde do consumidor, uma vez que a contaminação do mel com resíduos de sulfonamidas numa colméia mantém-se durante anos.



(a)

(b)

Figura 3 – Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas:
(a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.
Fonte: Internet: [44]

1.2 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, tendo sido desenvolvidas em 1935, pelo cientista Gerhard Domagk [45]. São compostos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Figura 4). Sua classificação é realizada com base no grau de absorção pelo trato gastrointestinal e através da duração de seu efeito [46].

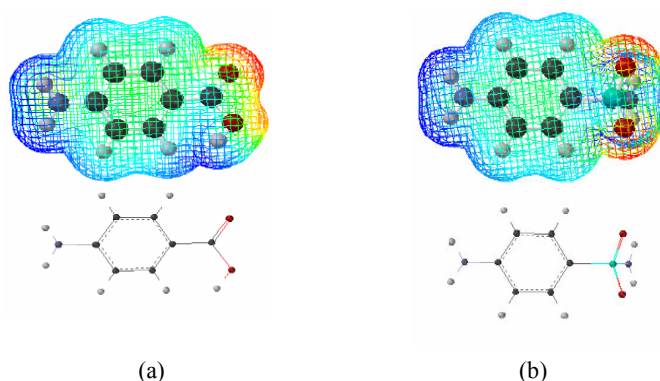


Figura 4 - Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida).
Fonte: Internet: [47]

Possuem ação bacteriostática e atuam competindo com o ácido *p*-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico, agindo de forma sistêmica, com ação de curta ou longa duração, dependendo do tipo [48].

Os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana das sulfonamidas estão reunidos na própria molécula da sulfanilamida. O grupo – SO₂NH₂ não é essencial em si, mas tem a importante característica do enxofre estar diretamente ligado ao anel benzênico [48].

Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, *pKa*, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica [48].

Quimicamente, as sulfonamidas são ácidos fracos, relativamente insolúveis em água, que apresentam *pKa* variado e são iônicas por natureza [49]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas relevantes das sulfonamidas em estudo nesta pesquisa.

Tabela 2 – Propriedades gerais das sulfonamidas.

Composto	CAS- Number	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)*	Sol. em H ₂ O* (mg /100 mL)	Log K _{ow}	<i>pKa</i>
Sulfadiazina	[68-35-9]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.26	13	0,12 ^b	6,50
Sulfadimetoxina	[122-11-2]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1	1,4 ^a	6,21
Sulfadimidina	[57-68-1]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	272.33	192	0,25 ^a	7,45
Sulfatiazol	[72-14-0]	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.32	1	--	7,24

Fonte: *[50] ; ^a [27]; ^b [51]

A solubilidade das sulfonamidas varia muito em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional. Em meios alcalinos a solubilidade é maior que em pH neutro e ácidos, aumentando em meio ácido de sais sódicos [52].

Em sua molécula as sulfonamidas contêm um grupo amina básico (-NH_2) e um grupo amida ácido (-NH-) que correspondem ao pK_{a1} e pK_{a2} , respectivamente; apresentando caráter anfótero, ou seja, em soluções básicas o comportamento das sulfonamidas é ácido, devido ao N1 (nitrogênio ácido, que apresenta capacidade de doar prótons), já em soluções ácidas o comportamento das sulfonamidas é básico, devido ao N4 (nitrogênio básico - que apresenta capacidade de captar prótons). A completa ionização é conseguida quando o pH do analito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de pK_a , para compostos ácidos e básicos, respectivamente [53].

Na Figura 5 é apresentado um esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio. Em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

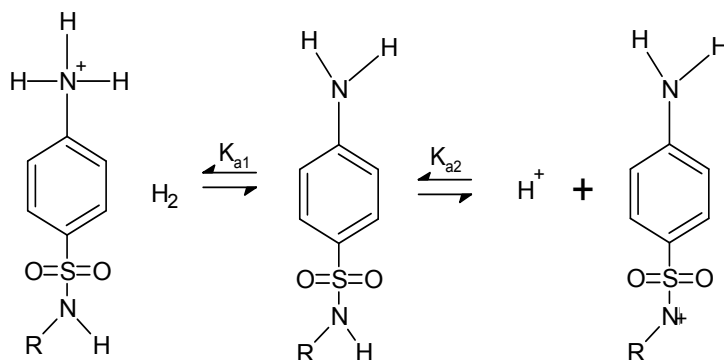
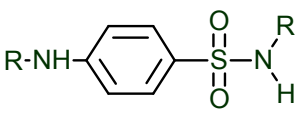
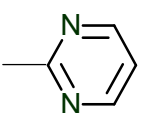
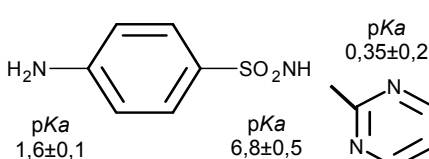
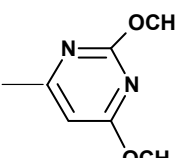
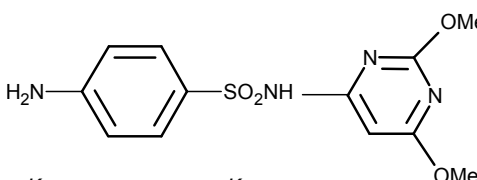
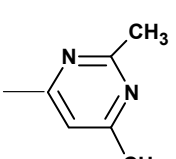
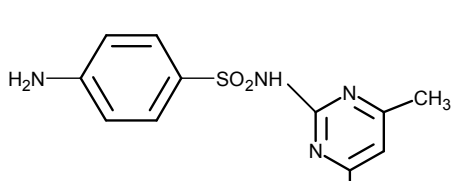
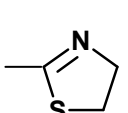
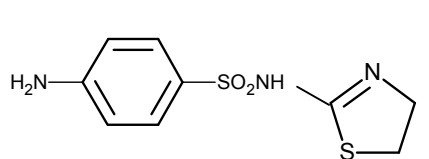


Figura 5 – Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.
Fonte: [53]

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares das sulfonamidas selecionadas para este estudo, bem como as variações dos valores de pK_a dos respectivos grupos funcionais das sulfonamidas.

Fórmula Geral das Sulfonamidas		
		
Sulfonamida	Radical	Estrutura Completa
Sulfadiazina (SDZ)		 pK_a 1,6±0,1 pK_a 6,8±0,5 pK_a 0,35±0,2
Sulfadimetoxina (SDX)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfadimidina (SDD)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfatiazol (STZ)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5

Quadro 1 – Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo

Fonte: adaptado de [51], [54] e [23].

1.2.1 Resíduos de sulfonamidas no mel

No que se refere à saúde pública, o monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos vem-se tornando um assunto cada vez mais discutido em nível mundial [51]. Uma grande variedade de fármacos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses,

os das classes: sulfonamidas, betalactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos [55].

Atualmente, grandes volumes de mel são solicitados por mercados internacionais, fazendo com que novas práticas apícolas sejam implantadas a fim de garantir que a produção esteja protegida de possíveis ataques de pragas, doenças ou contaminações [3].

A utilização de fármacos na prevenção e/ou tratamento de doenças na colméia é prática comum entre os apicultores. Resíduos de sulfonamidas podem ocorrer no mel como consequência da utilização destes fármacos no tratamento de doenças de origem bacteriana. A presença de resíduos de sulfonamidas no mel não é desejável, uma vez que o mel é um produto natural e saudável e que, como tal, não deve apresentar substâncias comprovadamente tóxicas.

As exposições de humanos a doses de resíduos de fármacos podem gerar possíveis efeitos prejudiciais à saúde do consumidor. Os efeitos mais comumente encontrados são reações alérgicas, desordens na flora intestinal e possível impacto da resistência de antimicrobianos utilizados em terapia humana. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se, ainda, que aproximadamente 5% dos pacientes humanos tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [56]. Deve-se salientar, entretanto, que ainda não existem evidências científicas demonstrando que esta associação seja decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [57].

1.2.2 Aspectos da legislação

Visando proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores em saúde pública estabeleceram níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) quanto à presença de fármacos em alimentos de origem animal [57]. O LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduo com o qual não ocorra perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) [52].

No Brasil, o Ministério da Saúde é quem estabelece os LMR e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os responsáveis pelas ações fiscais de vigilância do uso de fármacos em alimentos.

Na produção de produtos de origem animal o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do MAPA. O PNCR tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do mel e de outros produtos de origem animal, no território nacional, bem como o aporte dos produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas aos conhecimentos das violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais. Para isto, são colhidas amostras dos alimentos, junto aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) [57].

O LMR de sulfonamidas em mel fixado pelo PNCR é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina (Quadro 01, ANEXO 1).

A ANVISA, recentemente, vem implantando um Programa de Análise de Resíduos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) para diversos tipos de alimentos (leite, carnes, ovos e mel de abelhas), cujo objetivo é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária [58].

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

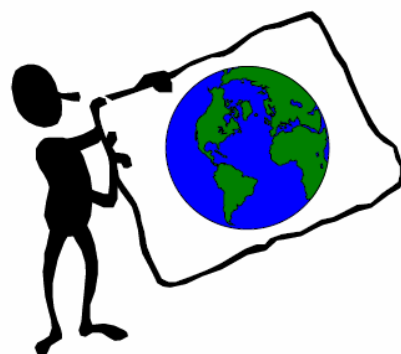
2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para determinar sulfonamidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Comparar diferentes tipos de processos de extração/pré-concentração de sulfonamidas, utilizando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de méis;
- Divulgar a problemática envolvendo a presença de fármacos em alimentos.

3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS



3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que procedimentos de controle de qualidade de alimentos sejam realizados a fim de verificar a presença de resíduos de sulfonamidas e outros contaminantes. O desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença destes resíduos em diferentes matrizes alimentícias tornam-se fundamentais [52]. Segundo Davidson e Branem [59], o monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de medicamentos veterinários tem aumentado devido à importância da repercussão em saúde pública.

A determinação de resíduos de sulfonamidas envolve quantificação de concentrações muito baixas, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. As técnicas analíticas mais comumente usadas para a quantificação destes resíduos são as cromatográficas, associadas a diferentes sistemas de detecção, tais como UV, arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas [52].

A cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos tem sido utilizada com êxito para determinar vários resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal [18]. Embora atualmente muitos métodos confirmatórios como, o CLAE-EM/EM, para a determinação de sulfonamidas em alimentos sejam citados na literatura, estes tipos de determinação requerem o uso de equipamentos caros sendo, portanto, de menor disponibilidade na maioria dos laboratórios de química, principalmente em universidades [60].

A análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento, extração e/ou *clean up* da amostra [49] devido à necessidade de separar, de uma matriz orgânica complexa, compostos em concentrações bastante baixas, de forma a minimizar a presença de interferentes na matriz.

Vários métodos de determinação das sulfonamidas em alimentos estão disponíveis na literatura internacional. Dentre os trabalhos sobre resíduos de sulfonamidas em mel por HPLC pode-se destacar: ZOTOU e VASILIADOU [11]; MAUDENS, ZHANG e LAMBERT [61]; MARTEL e ZEGGANE [62]; PANG *et al.* [63]; HORIE *et al.* [64]; dentre outros.

Zotou e Vasiliadou [11] desenvolveram um método seletivo para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel por SPE-RP-HPLC com detecção UV. A separação das sulfonamidas foi realizada usando coluna C18 (ODS-3), no modo isocrático, e como fase móvel utilizou-se metanol e solução-tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com 1% de ácido acético

(v/v). A detecção UV foi em 263 nm. As amostras de mel foram diluídas em solução-tampão acetato (0,05M) pH 3,6. Utilizou-se cafeína como padrão interno. A extração do resíduo foi realizada usando extração em fase sólida com cartuchos de fase polimérica (Nexus). Recuperações médias dos analitos variaram de 80 a 117%, com limites de detecção de 20 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Maudens, Zhang e Lambert [61] desenvolveram e validaram um método para determinação de doze sulfonamidas (sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina e sulfadoxina) em mel. O pré-tratamento da amostra incluiu uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L⁻¹, seguida por extração líquido-líquido e extração em fase sólida (utilizando cartucho de troca catiônica). A separação foi realizada utilizando-se coluna RP18, no modo gradiente, e com fase móvel constituída de acetonitrila e solução-tampão acetato (0,020 mol L⁻¹) pH 4,75. A detecção foi realizada em comprimento de excitação de 420 nm e comprimento de emissão de 485 nm. O método demonstrou boa exatidão e precisão. O pré-tratamento da amostra aumentou a eficiência do *clean up*. Foram encontradas recuperações médias, nos três níveis, variando de 38,2 a 66,8% e limites de detecção e quantificação de 1 ou 2 e 2 ou 5 ng g⁻¹, respectivamente.

Martel e Zeggane [62] descreveram um método para determinação de sulfatiazol em mel. Foi realizada uma etapa de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. Uma alíquota da amostra hidrolisada utilizando ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ e submetido a uma pré-coluna de derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com detector por fluorescência, usando coluna C18 (Hypersil BDS), no modo isocrático, e com fase móvel composta de acetonitrila e solução de ácido acético 2%. Para a detecção por fluorescência foi aplicado um comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. O limite de quantificação foi de 10 ng g⁻¹. As recuperações variaram de 60,6 a 71,8%. A estimativa do desvio padrão relativo variou na faixa de 0,5 a 2,9%.

Pang *et al.* [63] desenvolveram um método para a determinação de oito sulfonamidas (sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido fosfórico (pH 2). As amostras foram filtradas e em seguida procedeu-se à extração em fase sólida utilizando-se dois cartuchos um de troca catiônica e outro OASIS HLB. Procedeu-se à derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada por cromatografia líquida por detecção por fluorescência, usando coluna RP 18, no modo

isocrático, e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e solução de dihidrogeno-fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹. A detecção foi realizada com comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. Recuperações médias nos três níveis de fortificação variaram de 73,5 a 94,1% e coeficientes de variação de 4,35 a 16,60%. O limite de detecção foi de 0,002 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina, e 0,005 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina. O limite de quantificação foi de 0,005 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina e 0,010 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

Horie, Satto e Nose [64] desenvolveram um método usando cromatografia líquida por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) para a determinação simultânea de dez sulfonamidas (sulfatiazol, sulfacloropiridazina e sulfaquinoxalina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 30% e, então, extraídas com diclorometano. Os extratos foram percolados em cartucho de Florisil para realizar um *clean up* na amostra. A separação cromatográfica foi realizada em coluna RP-18 (Lichosphere), como fase móvel utilizou-se solução de dihidrogeno fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹) e acetonitrila. A detecção foi a 275 nm. As recuperações no nível de 0,05 µg g⁻¹ foram de 62,1 a 90,2% e os limites de detecção foram 0,05 µg g⁻¹ para cada composto.

Na Tabela 3 são apresentados métodos cromatográficos assim como os métodos de extração reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em mel e em outras matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
HAMMEL <i>et al.</i> [22]	Mel	SDZ,SMR,STZ,SPD, SAD,SMZ,TAP,SME, DAP,SID,SMTX,SDM, STR,DHS,CAP,SBM, OTC,AMP,TC,SDX, SQX,DMC,CTC,NEO, PENG,SPI,DC,PEN, DES,OLE,TIL,TYL, OXA,EA,CLOX,NAF, DIC,ROXI,AMOX,SCP	HPLC-ESI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 26-61% e Limites de detecção de 31,3-49,0 µg/kg
WANG <i>et al.</i> [65]	Mel e frango	SMT, SMR e SDZ	HPLC-DAD Imunoensaio com polarização fluorescente	Foram encontradas recuperações de 86-131%. Limites de detecção de 0.9 ng g ⁻¹ 3.1 ng g ⁻¹ .
TAMOSUNAS e PADARAUSKAS [66]	Mel e ovos	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPLC-MS/MS UPLC-MS/MS LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 80-110%. Limites de decisão de 6.61-9.43 µg kg ⁻¹ and 7.25-11.9 µg kg ⁻¹ para UPLC e LC, respectivamente.
GRANJA <i>et al.</i> , [67]	Mel	STZ, SMZ E SDM	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 61.0% a 94.5%. Limites de detecção de 3 µg kg ⁻¹ , 4 µg kg ⁻¹ and 5 µg kg ⁻¹ respectivamente
ZOU <i>et al.</i> , [68]	Mel	STZ, SPD, SDZ, SMR, SMMX, SCP, SMX, SDM	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações > 70%. Limites de detecção 4 µg kg ⁻¹ .
MOHAMED <i>et al.</i> [24]	Mel	SAD,DAP,SPD,SDZ, SMTX,STZ,SMR,SMX, SMP,SME,SCP,SQX, SDX,SDT,SSZ	HPLC-APPI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,4% e Limites de quantificação de 10 µg/Kg
KOESUKWIWAT <i>et al.</i> [23]	Leite	SDZ,STZ,SMZ,SMP, SMX,SDM,CTC,TC OTC,PYR	HPLC-ESI-MS SPE	Foram encontradas recuperações de 5-166% (nos vários níveis)
SUN <i>et al.</i> [9]	Envoltório para salsicha (tripa de origem animal)	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMDZ,SMT,SMMX, SMP,SIA,SMX,SDM, SQX	HPHPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 65,2-85,9%. Limites de detecção de 0,3-0,4µg/kg e limites de quantificação de 1,5-2,2 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
LU <i>et al.</i> [25]	Carne (suína)	SDZ,STZ,SMR,SMT, SMMX,SMXZ,SQX, SDMX	HPLC-ESI-MS HPLC-APCI-MS SPME	Limites de detecção de 16-39 µg/Kg e limite de quantificação de 53-130 µg/Kg
KISHIDA [26]	Carne (bovina, aves, suína)	SDD,SDZ,SMM,SMX, SDM,SQX	HPLC-MS MSPD	Foram encontradas recuperações de 90,5-97,6% e Limites de quantificação de 0,006-0,04 µg/g
GARCÍA <i>et al.</i> [17]	Visceras de animais (rim)	SDZ,SMT,SMP,SMX SDM,SQX	HPLC-DAD LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 46-63%. Limites de decisão de 3,48-3,84 µg/Kg e Capacidade de detecção de 109,8-161,7 µg/Kg
BISWAS <i>et al.</i> [69]	Carne (búfalo)	TMP,SDD,SDX,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 75-108%. Limite de detecção de 0,031µg/g e limite de quantificação de 0,062 µg/g
FELTRIN <i>et al.</i> [10]	Leite	SDX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 76-90% e limite de detecção de 4,59µg/L e limite de quantificação de 13,9 µg/L
ZOTOU e VASILADOU. [11]	Mel	SCT,STZ,SPD,SMR SMP,SMX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 80-117% e Limites de detecção de 20-25µg/Kg
WANG <i>et al.</i> [49]	Produtos de origem animal	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPHPLC,HPCE, THPLC,ELISA, IMUNOENSAIOS LLE,SPME,SPE	Vários artigos sobre sulfonamidas em alimentos de origem animal
GALLINA <i>et al.</i> [12]	Mel	Streptomycina, Tylosin, SAD,SDZ,STZ,SMZ, SDX,SMTX,SDM	HPLC-FL LLE	Foram encontradas recuperações de 11,5-96,5%. Limites de detecção de 1,7-22ng/mL e limites de quantificação de 5,5-75 ng/mL
PECORELLI <i>et al.</i> [70]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SMMX,SCP,SMX SQX,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 62,4-85,1% e Limite de decisão 105,3-109,5 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
KISHIDA e FURUSAWA [19]	Carne (aves) e ovos	SMM,SDM,HIDRÓXI/N ⁴ -ACETIL	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 90-97% e limites de detecção de 7,2-29,8 ng/mL
LAMBA <i>et al.</i> [71]	Leite	SAD,SGN,SDZ,STZ, SMTX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 85-114%. Limites de detecção de 1,59-7,68 nmol/L e limites de quantificação de 5,3-25,59 nmol/L
PANG <i>et al.</i> , [72]	Mel	STZ, SCT, SAI, SMM, SDX,SDZ, SPD, SCP, SMTX, SMR, SMP, SDM, SMZ, SME	HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70.9-102.5%. Limites de quantificação de 1.0 and 12.0 µg/kg
POSYNIAK <i>et al.</i> [73]	Carne (frango)	SDZ,SMZ,SMX,SMR, SDM,SMP	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações de 90-95%. Limites de detecção 1 ou 5 µg/Kg CCα: 103,8-127,6 µg/Kg CCβ: 115,0-137,4 µg/Kg
MAUDENS <i>et al.</i> [61]	Mel	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SME, SMT,SMP,SCP,SDX	HPLC-FL LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 37,4-66,8%. Limites de detecção de 1-2 ng/g e limites de quantificação de 2-5ng/g
PECORELLI <i>et al.</i> [18]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SQX,SDM,SCP, SMM,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 51-109% CCα: 105,2-116,2 µg/Kg CCβ: 110,9-134,9 µg/Kg
GENTILI <i>et al.</i> [60]	Carne e alimentos infantis	SID,SDZ,SPD,SMR, SMO,SMZ,SMT,SMP, SMM,SCP,SMX,SQX, SDM	HPLC-MS/MS	Foram encontradas recuperações de 70-101%. Limite de detecção de 2,6 ppb e limites de quantificação de 1,2-7,8 ppb
ZAYAS-BLANCO <i>et al.</i> [13]	Leite	SMZ	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 82,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 3µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
POSYNIAK <i>et al.</i> [74]	Mel	SCT,STZ,SMZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80%. Limites de detecção de 0,1µg/Kg e limites de quantificação de 0,2 µg/Kg
PANG <i>et al.</i> [63]	Mel	SCT,SPD,SMR,SMP, SME,SCP,SMX,SDM	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 73,5-94,1%. Limites de detecção de 0,005mg/Kg e limites de quantificação de 0,002 mg/Kg
REYBROECK [75]	Mel	Streptomycin, Tetracyclines, Cloranfenicols, SMZ, STZ,SCT	HPLC-UV	Limites de detecção para as sulfas de 25-50µg/Kg e limite de quantificação para as sulfas de 20µg/Kg
MARTEL e ZEGGANE [62]	Mel	STZ, SMZ	HPLC-FL IMUNOENSAIO DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 2µg/Kg
FURUSAWA [21]	Leite	OTC,SDD	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 88,8-93,1%. Limites de quantificação 0,044 µg/mL (OTC) e 0,023 µg/mL(SDD)
POSYNIAK <i>et al.</i> [76]	Mel	SCT,SMT,STZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80,9-83,4%. Limite de detecção de 0,1-0,5µg/Kg
HELLER <i>et al.</i> [77]	Ovos	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SMZ, SMT,S P,SCP,SMX, SMMX,SIA,SDM,SQX	HPLC-MS-MS HPLC-UV LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 51-103%
FURUSAWA [14]	Leite	SMZ,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 81-94%. Limites de detecção de 5-10ng/mL e limites de quantificação de 3-5ng/mL

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
STOEV e MICHAILOVA [78]	Produtos de origem animal	SAD,SDZ,SMR,SDD, SMP,SOX,SMX,SDM, SQX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 64-75% e Limites de detecção de 0,5-1,0 µg/g
ITO <i>et al.</i> [79]	Visceras de animais (rins e fígado)	SDZ,SMR,SDD,SMP, SAI,SMMX,SMTX, SDM,SQX	HPLC-UV HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70,8-98,2% e Limites de detecção de 0,03 µg/g
FURUSAWA [80]	Leite	SMZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações maiores que 83% e Limites de detecção de 4 µg/kg
HEERING <i>et al.</i> [81]	Mel	TC, Streptomycin, STZ	Imunoensaio - EIA	Foram encontradas recuperações de 100-105%. Limites de detecção de 50 µg/g
GEHRING <i>et al.</i> [82]	Salmão	SDZ	HPLC-API/MS	Foram encontradas recuperações de 59,2-78,3%. Limite de detecção de 0,2 ng/g e limite de quantificação de 1,0 ng/g
CANNAVAN <i>et al.</i> [83]	Carne	SMT	CG-MS SPE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 86-114% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
VIÑAS <i>et al.</i> [84]	Leite	SA,SGN,SDZ,SPD,SMX	HPLC-FL LLE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 82-104% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
HORIE <i>et al.</i> [64]	Mel	STZ,SDZ,SMR,SMP, SDD,SMMX,SCP, SMX,SQX,SDM	HPLC-DAD SEM EXTRAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 62,1-90,2%. Limites de detecção de 0,8µg/g
AGARWAL [15]	Leite	SDZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 83-88%
PATHY [85]	Carne	SQX	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 77-85%

3.1 PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise de quantidades muito pequenas (traços) de contaminantes em matrizes complexas como alimentos frequentemente requerem inúmeras etapas de preparação e extração de amostras antes das técnicas de análises instrumentais (detecção e quantificação). Dentre as várias etapas envolvidas na preparação de amostras, alguns passos são mais comuns, tais como amostragem (homogeneização), extração, *clean-up* (eliminação de interferentes), separação e concentração, detecção e quantificação dos analitos [86].

Técnicas, como a cromatografia a líquido, requerem uma etapa de preparo da amostra antes da análise, de forma a minimizar erros na análise e evitar danos nas colunas cromatográficas [87].

Atualmente existem vários métodos para o preparo de amostras, com inúmeras possibilidades, vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método quando se trabalha com matrizes complexas, como alimentos, exigem que o analista tenha o conhecimento tanto da matriz com a qual se está trabalhando assim como da técnica instrumental que será utilizada posteriormente para a detecção/quantificação do composto, a fim de evitar, principalmente, que interferentes possam ser co-eluídos juntamente com os analitos de interesse e efeitos de matriz sejam incluídos nos resultados [88].

Segundo Queiroz, Collins e Jardim [89], as técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo do analista gasto durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras em determinado tempo.

Dentre as técnicas de extração mais comumente utilizadas para concentrar analitos em mel pode-se destacar a extração em fase sólida (EFS) [11; 63; 72; 73 e 74], extração líquido-líquido (LLE) seguida de EFS [61], e extração líquido-líquido [12 e 22].

3.1.1 Extração por Fase Sólida (EFS)

A extração por fase sólida é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [88]. O método de extração por fase sólida foi desenvolvido na década de 70, visando resolver algumas desvantagens da extração líquido-líquido e otimizar rotinas [90].

É uma técnica que consiste na separação líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica, através da qual a solubilidade de interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição [88; 91]. Através de forças intermoleculares, do tipo das de Van der Waals ou dipolo-dipolo, entre o analito e a superfície adsorvente da fase sólida ocorre o mecanismo de retenção e eluição dos analitos. Dependendo do grau de afinidade do analito com o solvente de eluição, este terá maior ou menor retenção [88].

A extração por fase sólida tem vários objetivos [87], sendo eles:

- (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;
- (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes;
- (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito; e
- (d) estocagem da amostra, muito usada para evitar o transporte de grandes volumes das mesmas.

Existem dois tipos de sistemas de extração por fase sólida: em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema em linha, a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. No sistema fora de linha (*off-line*), a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor [91]. Nesta pesquisa, utilizou-se o método de extração em fase sólido com sistema off-line.

Na prática, para uma extração por fase sólida são utilizados tubos de polipropileno no formato de seringa, contendo a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia), usualmente denominada cartucho de extração [88], conforme mostrado na Figura 6.

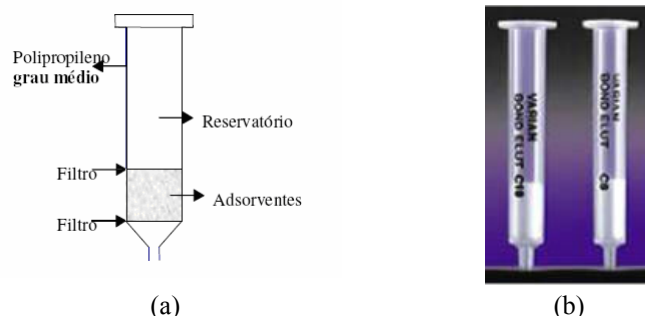


Figura 6 – (a) Esquema de cartucho para extração EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.
Fonte: (a) [88]

O atual estágio de desenvolvimento da extração em fase sólida deve-se em grande parte às descobertas de novos adsorventes [89]. No Quadro 2 são apresentados os principais tipos de adsorventes utilizados em extração em fase sólida.

Quadro 2 - Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.

Não-polares	Polares	Troca Iônica
Octadecilsilano – C18	Florisil – FL	Benzenossulfonilpropilsilano – SCX
Octilsilano – C8	Alumina – Al	Sulfonilpropilsilano – PRS
Etilsilano – C2	Sílica – Si	Carboximetilsilano – CBA
Metilsilano – C1	Cianopropilsilano – CN	Dietilaminopropilsilano – DEA
Fenilsilano – PH	Diolsilano – 2OH	Trimetilaminopropilsilano – SAX
Cicloexilsilano – CH	Aminopropilsilano – NH ₂	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA
	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA	
	Poliméricas (Nexus)	

Fonte: adaptada de [91]

Recentemente, alguns estudos visando desenvolver fases de EFS com aplicações mais específicas têm sido desenvolvidos. As fases poliméricas são exemplos típicos destas fases, as quais possuem maior capacidade de retenção que as de sílica, tendo seletividade usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel [93].

Na Figura 7 é apresentado um esquema do procedimento de extração em fase sólida. Na etapa A, ocorre a ativação e condicionamento do cartucho; na etapa B, ocorre a aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; na etapa C, ocorre a troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*) e, por último, na etapa D ocorre a troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

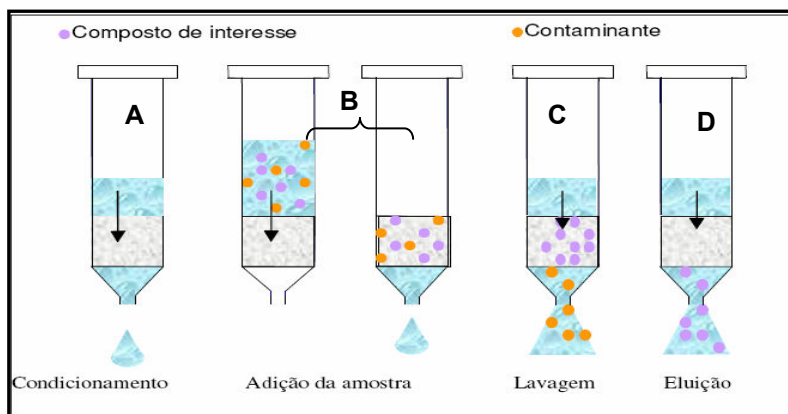
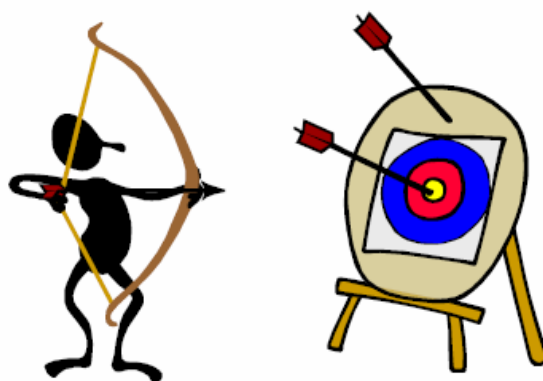


Figura 7 - Principais etapas empregadas em extração por fase sólida (EFS).

Fonte: [87]

Na prática, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com um pequeno vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Após a drenagem de toda a fase líquida, os analitos de interesse ficarão retidos na fase sólida do cartucho. O analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito pré-concentrado, ou seja, com a concentração apropriada para a análise [88].

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO



4.VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nenhuma análise química, automatizada ou manual, fornece resultados isentos de erro. Geralmente, os resultados são reportados em forma de valores numéricos que contêm informações que devem ser corretamente interpretadas e avaliadas, de acordo com as especificações do método e as necessidades de cada usuário do mesmo resultado [93]. Neste contexto, dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico, ou mesmo a adaptação de um método já existente, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [94].

Segundo o INMETRO [95], a validação de um método de ensaio é a denominação que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida. O processo de validação de métodos analíticos desenvolvidos em laboratórios é efetuado após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos. Para Barros [96] a validação do método analítico permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [97] e que envolve várias etapas. A NBR/ISO IEC 17025 [98] define que um processo de validação deve incluir a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método. Todo processo de validação deve ser abrangente o suficiente, de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos [97].

Existem vários órgãos internacionais responsáveis por processos de validação, que estabelecem muitos conceitos e procedimentos sobre este processo, gerando um grande volume de informações. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os responsáveis por processos de validação. Estes órgãos disponibilizam guias, diretrizes ou mesmo normas, para o procedimento de validação de métodos analíticos.

No Quadro 3 são apresentados os principais critérios utilizados para a validação de métodos segundo os mais reconhecidos órgãos de regulamentação, nacionais e internacionais.

Quadro 3 - Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO	ICH	USP	IUPAC
Especificidade/Seletividade	x	x	x	x	x ¹
Faixa de trabalho e Faixa linear	x	x	x	x	x
Linearidade	x	x	x	x	x ¹
Limite de Detecção	x	x	x	x	x
Limite de Quantificação	x	x	x	x	x
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	-	-	-	x
Exatidão e tendência	x ¹	x	x ¹	x ¹	x
Precisão (repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade)	x ²	x	x ¹	x ¹	x
Robustez	x	x	x	x	x
Incerteza de medição	-	x	-	-	x

¹ - Realiza calibração; ² - Não realiza tendência

Os principais parâmetros utilizados para a validação de métodos cromatográficos são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez [97]. A Figura 8 mostra um fluxograma com as etapas do procedimento analítico para a validação do método para análise de resíduos de sulfonamidas em mel proposto neste trabalho.

4.1 FAIXA DE APLICAÇÃO

A faixa de aplicação de um método refere-se ao intervalo entre a concentração superior e inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade [99].

Na prática a faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, e é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão [99].

Segundo Thompson *et al.* [100], a IUPAC estabelece duas faixas de aplicação, uma para impurezas (0-150%) e outra para macro-componentes (50-150%), sendo que o valor esperado deve estar contido dentro de uma destas duas faixas. A AOAC [101] recomenda que, para análise de traços, a faixa seja compreendida entre o limite de quantificação e duas ou três vezes o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Na análise de fármacos, a ANVISA indica uma faixa de aplicação entre 80-120% da concentração teórica do analito, e recomenda que seja determinado intervalo linear de, no mínimo, 5 níveis de concentração diferentes [102].

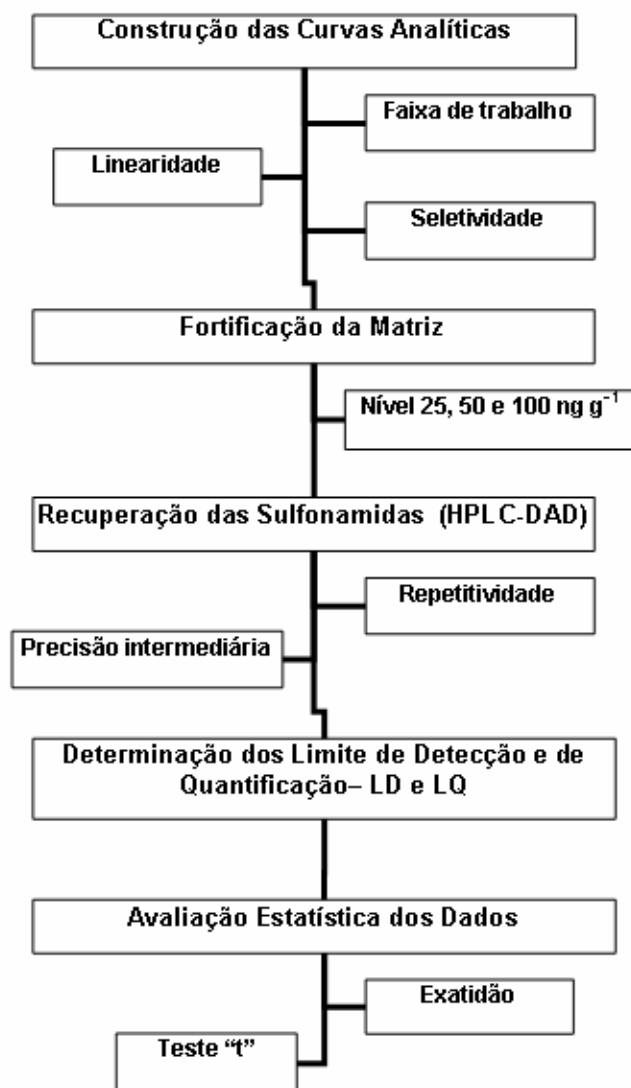


Figura 8 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação [97].

A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico [103]. Na maior parte das vezes uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito deve ser determinada empiricamente e pode ser representada como uma equação de reta, geralmente chamada de curva analítica ou gráfica de calibração, que representa a resposta de um método analítico como função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido [104].

Segundo Hubert *et al.* [105] uma outra forma de se avaliar a linearidade é por meio da relação entre concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear.

Em geral recomenda-se que o coeficiente de correlação seja maior que 0,990, sendo considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a regressão [95]. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [97].

4.3 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método analítico determinar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz [103]. A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da matriz, tais como, impurezas, ingredientes ativos, excipientes, e outros compostos de formas similares que possam estar presentes [106].

A seletividade é um parâmetro muito importante quando se trabalha com análises de multiresíduos. Deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, não sendo um parâmetro a ser realizado uma única vez, e sua realização deve ocorrer de forma contínua. Conhecer os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a análise ajuda na escolha das melhores condições para detecção. É através da seletividade que se garante que o pico cromatográfico seja o do composto em estudo [97].

4.4 PRECISÃO

A precisão refere-se à proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas [99]. Pode ser expressa pelo desvio dos resultados em relação à sua média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV) [97], conforme apresentado na equação 1.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{X}$ = média das recuperações.

Em análises de traços são aceitos valores de RSD de até 20%, já para métodos que quantificam compostos em macro-quantidades, o RSD deve ser de 1 a 2%. A precisão também pode ser melhorada através de um maior número de replicatas [107].

Comumente, a precisão de um método analítico em validação de métodos pode ser expressa como repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade [100].

4.4.1 Repetitividade

A repetitividade (ou repetibilidade) refere-se à precisão entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições, equipamentos, analistas, em um curto intervalo de tempo [99]. O INMETRO [95] recomenda sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r').

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo a mais aconselhável de ser adotada. Tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente os resultados não tenham diferença [99; 97]. O número de ensaios para a precisão intermediária segue a mesma recomendação que para a repetitividade segundo INMETRO [95].

4.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, ou seja, em localidades diferentes, utilizando um mesmo conjunto de amostras [103]. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratoriais), e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em legislações, ou farmacopéias etc... [97].

4.5 EXATIDÃO

A exatidão é estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [103]. Sempre se considera a exatidão dentro de certos limites, a um dado nível de confiança [97]. Para a ANVISA [58] e o ICH [99] é necessário um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração.

Os procedimentos mais recomendados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do analito. Para a análise de matrizes biológicas, como alimentos, os ensaios de recuperação são os mais utilizados [97; 103].

4.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação pode ser definido como a quantidade de analito presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada [100]. A recuperação está relacionada com a exatidão, porque reflete a quantidade de determinada substância recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra [103].

Na prática, o estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, também sendo denominada de fortificação. A equação 2 apresenta a relação utilizada para os cálculos da percentagem de recuperação.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

Na Figura 9 é mostrado o esquema proposto por Brito [108] para representar o processo de fortificação.

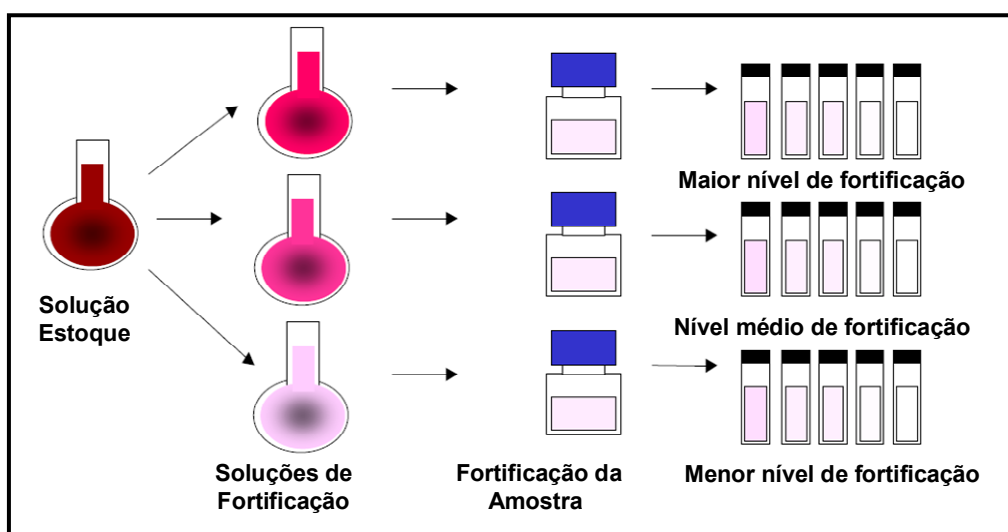


Figura 9 - Processo de fortificação das amostras.
Fonte: [108]

A limitação do procedimento de recuperação baseia-se no fato de que a substância adicionada não se apresenta na mesma forma que a encontrada originalmente na amostra, devendo-se ter o cuidado de reproduzir ao máximo as condições originais da amostra. Outro fator limitante para os ensaios de recuperação é o efeito da matriz, uma vez que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, sendo necessário investigar e eliminar estes efeitos dos interferentes [104].

Para garantir que os resultados sejam confiáveis é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, devendo-se avaliá-la na faixa de concentração esperada do composto de interesse [97].

Segundo a Comunidade Européia [109] os intervalos aceitáveis para recuperação em análises de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Contudo, em função da complexidade da composição da amostra esta faixa de variação pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 35\%$.

No estudo de recuperação também são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de *Student* de acordo com a equação 3. Se o valor “t” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato.

$$t_{calc} = \frac{(\text{Rec} - 100)}{s_{rec} / \sqrt{(n-1)}} \quad (3)$$

Onde: Rec é a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 é a recuperação percentual desejada; n é o número de determinações (em geral, um mínimo de 5 repetições); s_{rec} é o desvio padrão nas recuperações.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual para a determinação do limite de detecção, pelo método da relação sinal/ruído e por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica [97].

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração detectável em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas; S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*).

4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas [97]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [103].

A determinação do valor do limite de quantificação do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a validação dos resultados, tornando o método menos preciso [110]. Concentrações maiores para o limite de quantificação deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão [96].

O limite de quantificação também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o limite de detecção, sendo que para o limite de quantificação a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e, a equação utilizada é demonstrada na equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

5. MATERIAIS E MÉTODO



5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do método para a determinação de sulfonamidas em amostras de mel cinco etapas foram planejadas. A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a revisão bibliográfica sobre a ocorrência de sulfonamidas em alimentos e mel de forma a reunir dados científicos e literatura para oferecer suporte no desenvolvimento do método. A segunda etapa consistiu no estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas para a análise quantitativa. Uma vez otimizados os parâmetros cromatográficos estes foram fixados e em seguida foram obtidas curvas analíticas dos compostos. Na terceira etapa foi feito um estudo de pré-tratamento da amostra utilizando hidrólise ácida e também foram estabelecidas e otimizadas as condições de extração em fase sólida. As amostras usadas nesta etapa foram às coletadas na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA. Na quarta etapa procedeu-se à validação do método proposto. A última etapa foi realizada pela aplicação do método, utilizando-se amostras de méis comerciais coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins.

5.1.1 Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas

As amostras de mel foram coletadas no apiário Turimel, localizado na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA que está localizada na região do Alto Turu, no estado do Maranhão, às margens da BR 316. A área total do município é de 904, 95 km², localizando-se próximo à fronteira do Estado do Pará, a 420 quilômetros da capital do Maranhão, São Luís.

Segundo apicultores do local a flora comumente visitada pelas abelhas da região inclui as seguintes plantas (nomes populares): chanana, assa-peixe, vassourinha de botão, hortelãzinho, bamburral, juçara, embaúba, maria-mole, cajueiro, laranjeira e seringueira.



Figura 10 – Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.

Fonte: adaptado de [111]

A coleta das amostras para o desenvolvimento do método foi realizada no mês de setembro de 2007. O critério estabelecido para a coleta das amostras a serem utilizadas para o desenvolvimento do método foi a ausência de resíduos de fármacos e outros resíduos de contaminantes. Optou-se por fazer a coleta neste apiário após análise do histórico produtivo do apiário, onde se evidenciou a preocupação com a qualidade do produto. O apiário, atualmente, está buscando certificação orgânica, fato este que serve como indício de que o mel produzido neste apiário seja livre de resíduos de contaminantes.

Foram coletados 30 kg de mel e estes foram armazenadas em frascos de vidro envoltos por papel alumínio a fim de evitar degradação de alguns compostos por ação da luz. Outro cuidado tomado com as amostras foi manter uma vedação dos frascos eficiente, visando impedir a entrada de ar e início de possíveis processos fermentativos. As amostras foram conservadas a temperatura ambiente.

Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para o início das atividades de pesquisa.



Figura 11 - (a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.

5.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram:

5.2.1 Padrões

- Sulfadiazina (SDZ) – Sigma Aldrich, com pureza de $\geq 99\%$;
- Sulfadimetoxina (SDM) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfadimidina (SDD) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfatiazol (STZ) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% .

5.2.2 Reagentes e Solventes

- Metanol (HPLC solvent Merck-Germany);
- Acetonitrila (HPLC solvent Merck-Germany);
- Água ultra pura (Milli-Q), sistema Millipore;
- Acetato de Sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) M.M. 136,09 - Merck-Germany ;
- Ácido Acético Glacial P.A. (CH_3COOH)- M.M 60,05 - Merck-Germany.

5.2.3 Dispositivos para Extração por Fase Sólida

- Octadecil silano (C_{18}): cartucho - C_{18} – 500 mg/6mL – AccuBON^{II}ODS – Agilent Technologies;

- Octil silano (C₈): cartucho - Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- Cartucho: ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian.

5.2.4 Coluna Cromatográfica

- Coluna cromatográfica analítica - Phenomenex – 150mm x 4,0 µm d.i, recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica.
- Coluna de Guarda para coluna C-18 – Phenomenex, KJ0-4282.
- Coluna cromatográfica analítica C₈ - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb-Varian.

5.2.5 Equipamentos

- Balança eletrônica, modelo Bel Mark 210A, faixa de pesagem de 10mg-210g – Bell Engineering, Italy;
- Banho ultra-som USC 1450 – Unique Thorton, Brasil;
- Bomba de vácuo – Marconi, modelo MA058, Brasil;
- Cromatógrafo a Líquido marca Varian (EUA), composto por:
 - Bombas de alta pressão - binária - Varian Polaris ProStar 210/210;
 - Injetor manual, loop 20µL - Rheodyne;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, Varian Polaris ProStar 335 – Varian (EUA);
 - Computador Digital, Intel Core 2, 2,4 GHz, HD 160 Gb, com impressora HP Deskjet D 4160;
- Deionizador de água – Milli-Q Academic System – A10, sistema Millipore (EUA);
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian (EUA);
- Rotaevaporador – Fisatom – Brasil, modelo 802;
- pHmetro Hanna Instruments, com eletrodo de pH HI 1110B (vidro combinado) modelo pH 21, Brasil;

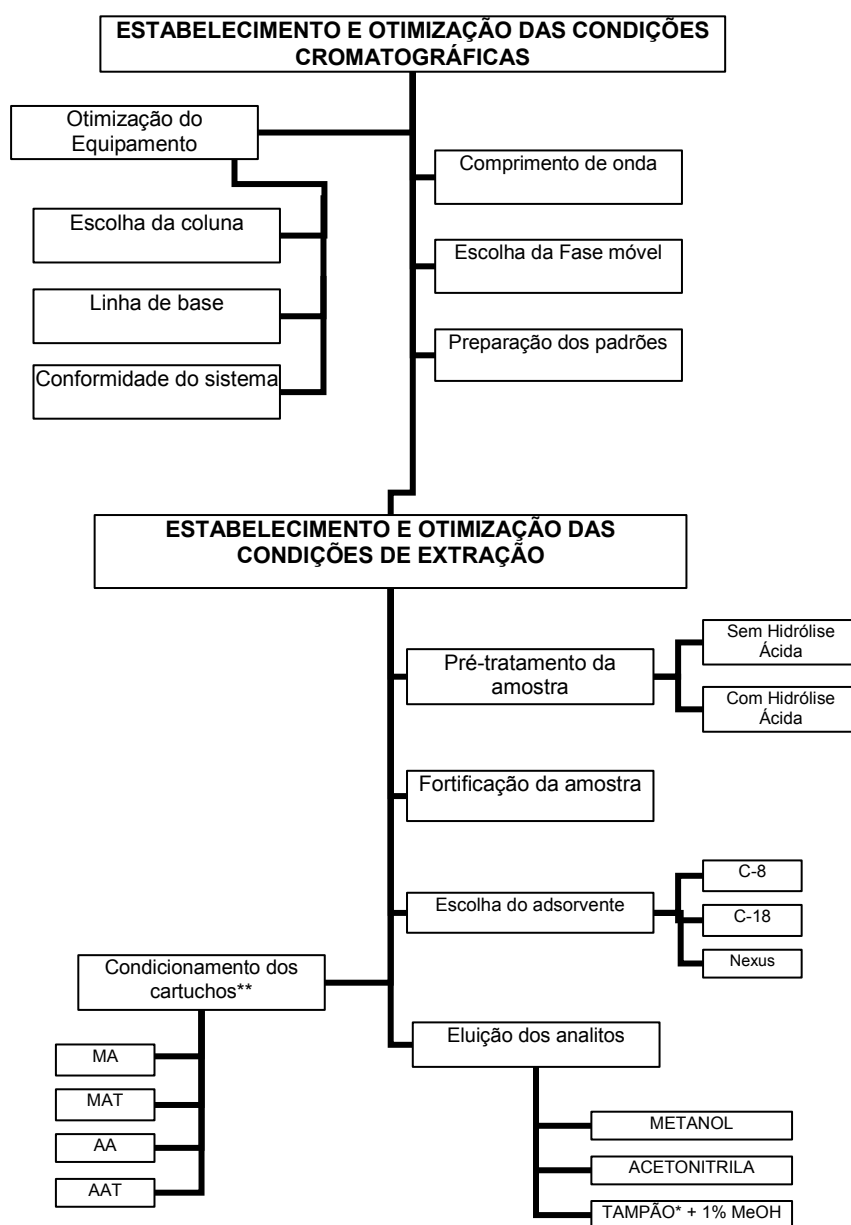
5.2.6 Outros materiais

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0 e 1000,0 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 10 e 100 mL;
- Espátula de aço inox;
- Membrana Acetato de celulose, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - SartoriusMerck;
- Membrana de Vidro, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - Merck
- Detergente Extran – Merck;
- Outros materiais de laboratório (Becker, proveta, micro pipetadores (100-1000 µL e 10-100 µL), funil de separação, pipeta, pipeta de *Pasteur*);
- Sistema de extração a vácuo (*manifold*), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (EUA).
- Gás nitrogênio (N₂) – *White Martins* (Brasil);

5.3 MÉTODO

Os métodos de análises de resíduos de sulfonamidas são desenvolvidos para atender as análises de analitos individuais e análise simultânea de vários resíduos, denominadas “análise multiresíduo”. O desenvolvimento de métodos multiresiduais, em geral, são muito trabalhosos, uma vez que são determinados analitos com características diferentes sofrendo também interferência dos constituintes da matriz que normalmente interferem na análise.

A Figura 12 mostra um fluxograma com a visão geral das etapas do procedimento analítico para o estabelecimento das condições cromatográficas e condições para as extrações.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

** MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.

Figura 12 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.

5.3.1 Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas

A primeira etapa para o estabelecimento das condições cromatográficas consistiu na otimização do equipamento, onde foram realizados os experimentos para escolha da coluna, linha de base e conformidade do sistema (de acordo com os critérios citados por SHABIR,

[113]). O estudo das condições cromatográficas compreendeu seleção do comprimento de onda, escolha da composição da fase móvel e solvente para preparação das soluções-padrão.

5.3.1.1 Seleção da coluna

Para a análise das sulfonamidas foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octilsilano C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb -Varian) e a outra contendo uma fase estacionária octadecilsilano C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm - Phenomenex).

5.3.1.2 Linha de Base do Solvente

É o sinal obtido pelo sistema cromatográfico detector DAD, mais a coluna utilizada com a injeção do solvente. O sinal da linha de base foi obtido injetando-se 20 µL de metanol, um dos solventes a ser utilizado nos procedimentos de desenvolvimento e validação do método. Este teste também forneceu informações sobre o grau de pureza do mesmo, que deve ser grau resíduo (CLAE), necessário para análise de traços de fármacos, com um mínimo de impurezas possível.

5.3.1.3 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada na etapa de otimização do equipamento, assim como no desenvolvimento e validação do método. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção (k'), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critérios de aceitação foram utilizados os parâmetros recomendados por Shabir [113], conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Limites
Fator de retenção (k')	$1 < k' < 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$
Número de pratos teóricos da coluna sendo usada (N)	$N/m > 8000$

Fonte: adaptado de [113].

5.3.1.4 Seleção do Comprimento de onda

Foram realizados dois testes para obtenção dos espectros de absorção, um utilizando espectrofotômetro modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) e outro usando o próprio detector do cromatógrafo (ProStar 335 - Varian). Os espectros de absorção obtidos no espectrofotômetro corresponderam a uma varredura de 190 a 300 nm e a varredura feita no detector do cromatógrafo correspondeu a 250 a 280 nm. O comprimento de onda correspondente à absorbância média dos analitos foi posteriormente utilizado para a determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos.

5.3.1.5 Seleção da fase móvel

Para a análise cromatográfica (CLAE) dos analitos foram testados seis tipos de fases móveis, no modo gradiente.

O preparo dos solventes para a fase móvel consistiu na filtração em kit para filtração com membrana de porosidade 0,45 µm para solventes, orgânicos e água, e desgaseificação em banho ultra-som por 20 minutos para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em garrafas próprias para solventes e foram rotuladas com informações a respeito da sua composição e o valor do pH. Antes do início dos trabalhos as soluções permaneceram no banho ultra-som por 10 minutos para a retirada de gases dissolvidos.

5.3.1.6 Preparação dos padrões

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas, individualmente, pela dissolução dos padrões em metanol. Pesou-se em balança analítica 0,0010g da sulfonamida e solubilizou-se cada uma em metanol, completando-se o balão para 0,01 L de solução. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar rotulado e com tampa de rosca para ser estocado. As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4°C, para evitar degradação dos padrões.

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o teste a ser realizado. Foram utilizados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho: solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 4,5 e solução aquosa de ácido acético 0,1%. As soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações e usadas para fortificação das amostras e para preparo das soluções padrão em extrato para os testes de recuperação e linearidade.

Os padrões foram injetados individualmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após conhecido o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos (solução contendo uma mistura dos quatro padrões – solução mix, a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

5.3.2 Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração

Os métodos de análises cromatográficas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. A etapa de extração em geral é o ponto crítico da análise, por ser responsável por erros nos resultados. As etapas de estabelecimento e otimização das condições de extração consistiram no pré-tratamento da amostra (hidrólise ácida), escolha do adsorvente (C8, C18 e Nexus), condicionamento dos cartuchos (metanol:água; metanol:água:tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5); acetonitrila:água; acetonitrila:água: tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5) e escolha do solvente para eluição (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 com adição de 1% de metanol).

5.3.2.1 Pré-tratamento da amostra

O mel é uma amostra complexa composta por várias substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes. Para diminuir o efeito da matriz na análise cromatográfica alguns trabalhos na literatura sugerem uma etapa de hidrólise ácida antes da extração a fim de romper possíveis ligações de interferentes com os analitos de interesse.

No presente trabalho, foram realizados vários testes para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. A massa de mel foi fixada em 1,0 g, de forma a diminuir o número de variáveis a serem testadas. Os parâmetros estudados

foram: concentração do ácido, volume de ácido a adicionar, tempo de hidrólise e forma de agitação. Na Tabela 5 são apresentados os testes realizados.

Tabela 5 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

A etapa de hidrólise ácida propriamente dita consistiu na adição de um volume de ácido em 1,0 g de mel. A solução de mel (extrato) foi levada para agitação por um determinado tempo. Após a hidrólise ácida os extratos hidrolisados de mel tiveram seu pH ajustado para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e solução tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5. Os extratos de mel após ajuste do pH foram filtrados em membrana de filtração (membrana de acetato de celulose) para retirada de quaisquer partículas que possam estar presentes no extrato.

5.3.2.2 Seleção do adsorvente

Visando obter uma melhor recuperação do analito, três adsorventes foram avaliados, sendo eles:

- EFS Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- EFS ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian;
- EFS C₁₈ – 500 mg/6mL – AccuBOND^{II} ODS – Agilent Technologies.

5.3.2.3 Condicionamento dos cartuchos

Os solventes testados para o condicionamento do cartucho e suas proporções foram:

metanol:água (1:1); metanol:água:tampão (1:1:1); acetonitrila:água (1:1); e acetonitrila:água:tampão (1:1:1).

5.3.2.4 Eluição dos analitos

Para verificar a melhor condição de extração das sulfonamidas foram testados três solventes para eluição, sendo eles: metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5 com adição de 1% metanol.

5.3.2.5 Extração por EFS

A fortificação das amostras para os estudos de extração consistiu na adição de volumes de solução padrão dos analitos no mel, de forma que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 µL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L⁻¹.

Os cálculos realizados foram realizados do seguinte modo: para se obter a concentração de 0,10 mg L⁻¹ das quatro sulfonamidas em 1000 µL de solução final, por exemplo, necessita-se de $10 \times 10^{-3} \text{ mg}$ $\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1} \right)$.

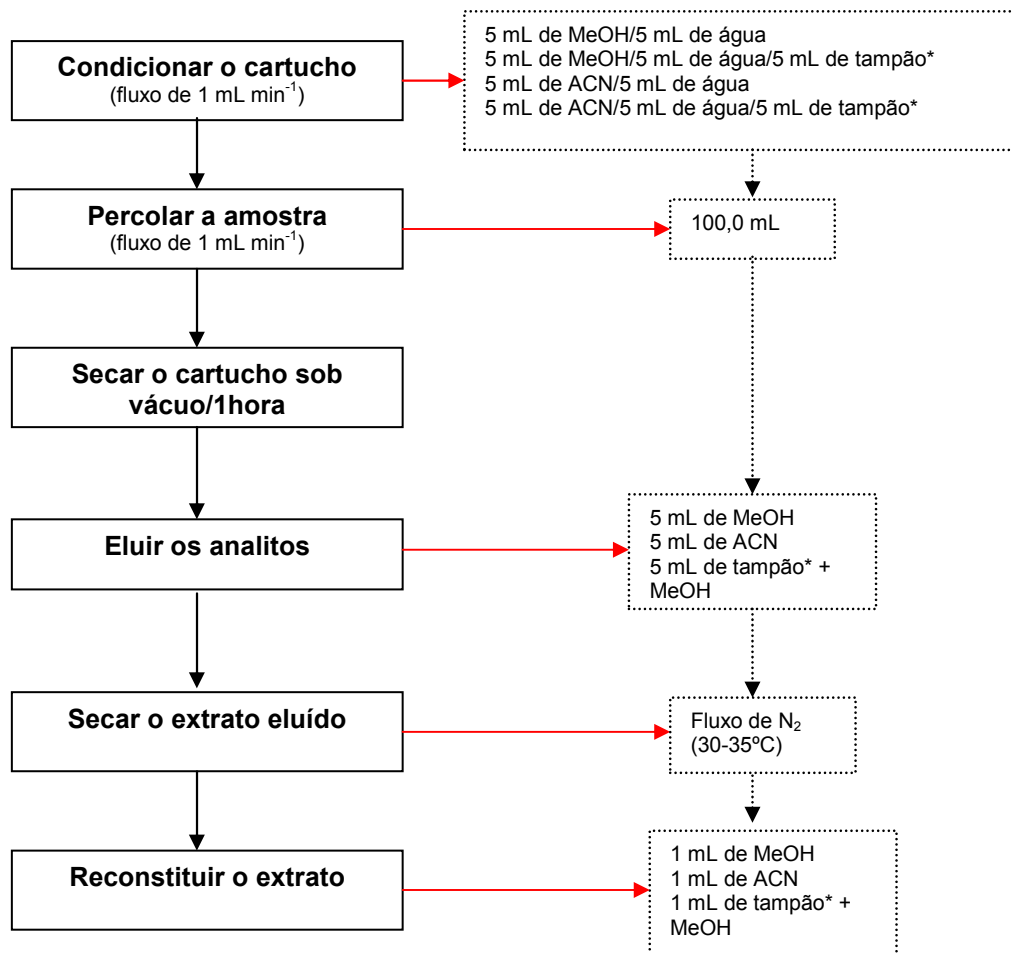
Como foi percolado um volume de 100,0 mL de extrato de mel hidrolisado enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 0,10 mg L⁻¹

$\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow C = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ mg}}{100 \times 10^{-3} \text{ L}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \right)$. Partindo-se de uma solução estoque de 1,0 mg L⁻¹,

o volume da solução padrão mista a ser adicionado no extrato de mel é de 10 mL $\left(C_{\text{padrão}} \cdot V_{\text{padrão}} = C_{\text{amostra}} \cdot V_{\text{amostra}} \rightarrow 1,0 \text{ mg L}^{-1} \times V_{\text{padrão}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 100 \text{ mL} \rightarrow V_{\text{padrão}} = 10 \text{ mL} \right)$.

Para a extração das amostras, testemunha e fortificada, foram realizadas utilizando-se sistema de extração (Manifold) sob vácuo. Antes da percolagem da amostra através do cartucho este foi condicionado com solventes, vazão de fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0 mL da amostra (fluxo de 1 mL min⁻¹), os cartuchos foram secos sob vácuo por 45 minutos. Procedeu-se a eluição dos analitos com 5 mL de solvente, em seguida os analitos eluídos foram secos sob N₂ a temperatura ambiente e posteriormente retomados com 1000 µL de solvente. Os extratos foram em seguida injetados para análise cromatográfica.

A Figura 13 mostra um esquema com as etapas do procedimento analítico para os testes de extração para determinação de sulfonamidas em mel.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

Figura 13 - Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração EFS.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA [60] e Comunidade

Européia (*EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE*) [109] para análise de resíduos em alimentos.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se testes em quintuplicata, de padrões e amostras testemunhas, com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada sulfonamida.

5.4.2 Linearidade

A região linear de resposta do detector foi determinada através de cálculo de regressão linear da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções-padrão assim como com amostras testemunhas fortificadas nas mesmas concentrações que as soluções-padrão. As soluções foram preparadas a partir de uma solução intermediária de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram injetadas cinco vezes. As concentrações utilizadas para o estudo das sulfonamidas foram: 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa linear de trabalho). Construiu-se o gráfico de calibração para os compostos estudados, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo x e os valores das áreas dos picos no eixo y.

A linearidade e a sensibilidade do método foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica. A linearidade foi expressa como o coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

5.4.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O Limite de detecção (LD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas. Para isso, foram estabelecidas as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. O Limite de quantificação (LQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas.

Determinou-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse para calcular os limites de detecção e de quantificação.

5.4.4 Estudo de recuperação

Os estudos de recuperação foram utilizados para avaliar o método quanto à precisão e exatidão; este foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 5.5).

O procedimento experimental consistiu da adição de volumes da solução padrão no mel, para que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 μL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L^{-1} .

5.4.4.1 Precisão

Foram realizados dois testes quanto à precisão do método. Verificou-se a precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de duas amostras de mel fortificadas a concentração de 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, os testes foram realizados em quintuplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Já a precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de duas amostras de mel em 3 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 25, 50 e 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

5.4.4.2 Exatidão

Os resultados e as conclusões com os dados obtidos do método analítico foram submetidos à avaliação estatística, e a expressão dos resultados foi apresentada em um determinado intervalo de confiança relacionado com os valores de exatidão e precisão dos resultados. Aplicou-se o teste “t” de *Student* nos resultados.

5.5 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras comerciais de mel, coletadas no Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (estados vizinhos ao Maranhão). Na Figura 14 é apresentado um esquema com o método proposto para a determinação de sulfonamidas em mel.

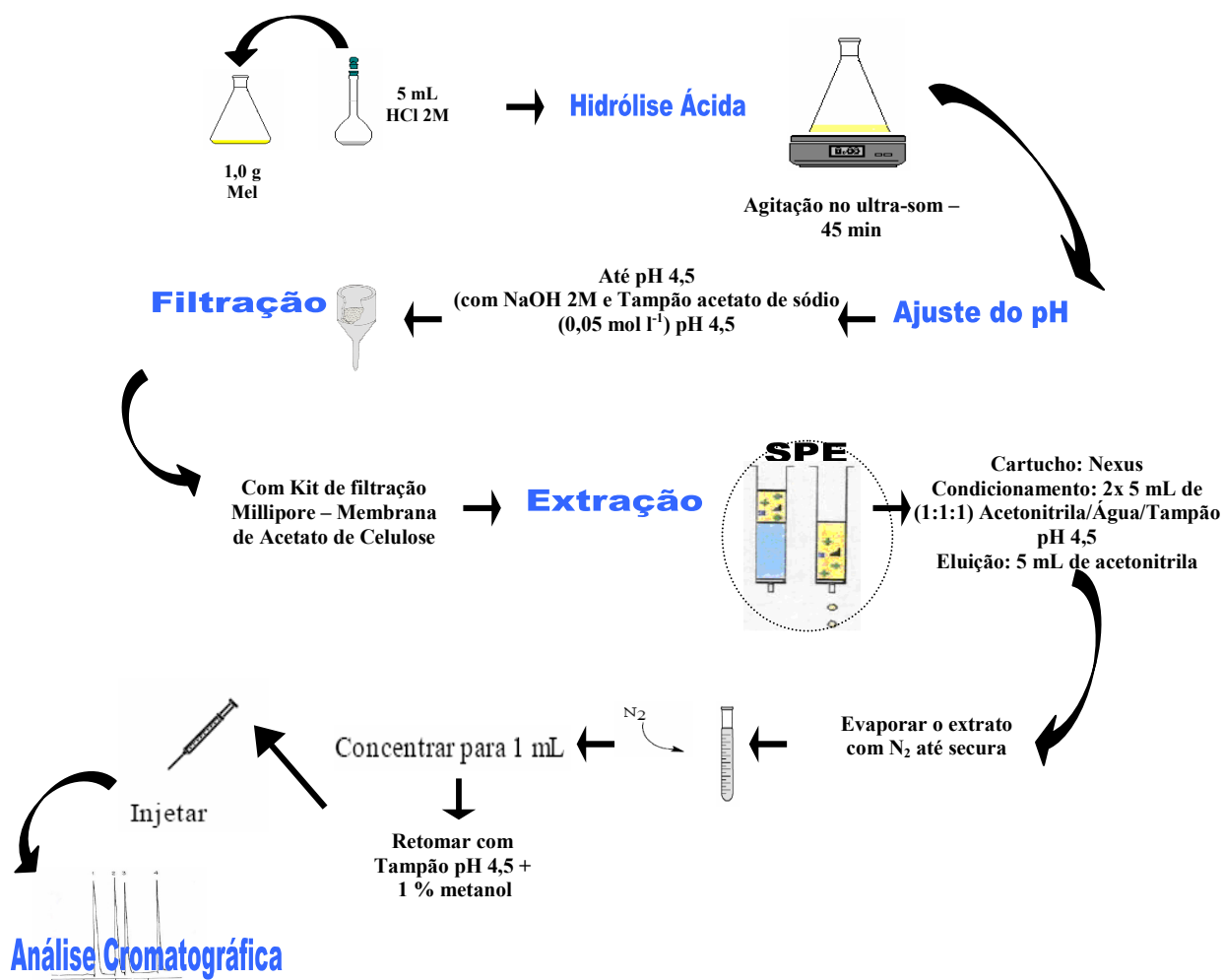


Figura 14 - Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por ZOTOU e VASILIAOUDOU [11] para a determinação de sulfonamidas em mel por HPLC-DAD que emprega solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6; como fase estacionária a coluna C18 e fase móvel: metanol e solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6, com adição de 1% de ácido acético, no modo isocrático. Os autores realizaram testes de extração em fase sólida com vários cartuchos e solventes para eluição. Para a etapa de extração foi utilizado o método recomendado por MAUDENS *et al.* [63] como referência inicial, que utilizou hidrólise ácida com ácido clorídrico 2M e extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C18.

6.1 SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Na Tabela 6 são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 300 nm para as sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram posteriormente selecionados na determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos. Os testes foram realizados com as sulfonamidas com concentração em 1 mg L⁻¹ em metanol.

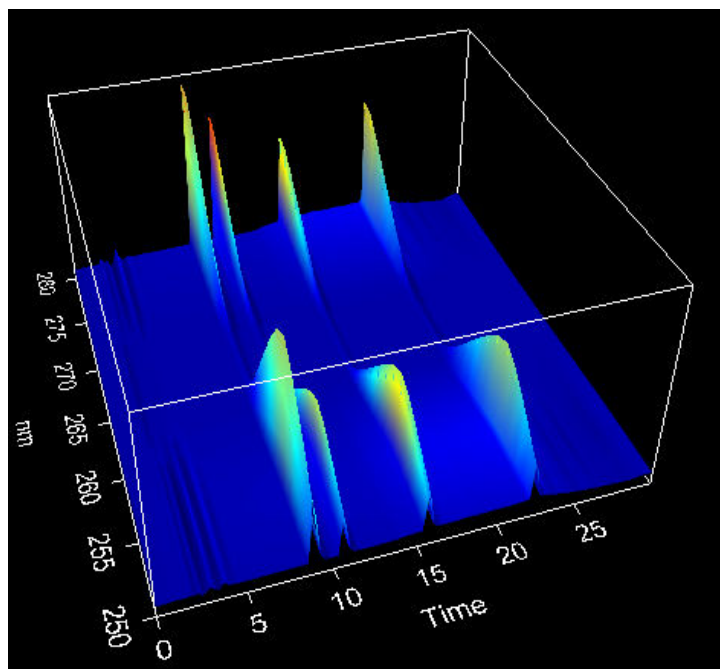
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.

Composto	λ máx (nm)
Sulfadiazina	270
Sulfadimetoxina	272
Sulfadimidina	269
Sulfatiazol	260

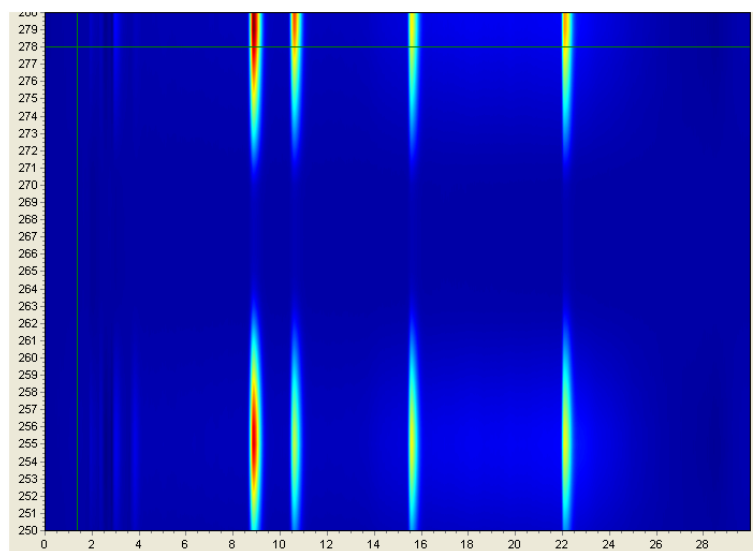
Nas Figuras 15 (a e b) e 16 (a e b) são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção na região do UV (250-280 nm) e os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda na região UV em estudo.

Os resultados encontrados em ambos os equipamentos confirmam o comprimento de onda de máxima absorção, 278 nm, para a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e

sulfadimetoxina. Para sulfatiazol, embora a máxima absorção não ocorra em 278 nm, resultados satisfatórios foram obtidos neste comprimento de onda, justificando a escolha deste comprimento de onda para os quatro compostos em estudo.

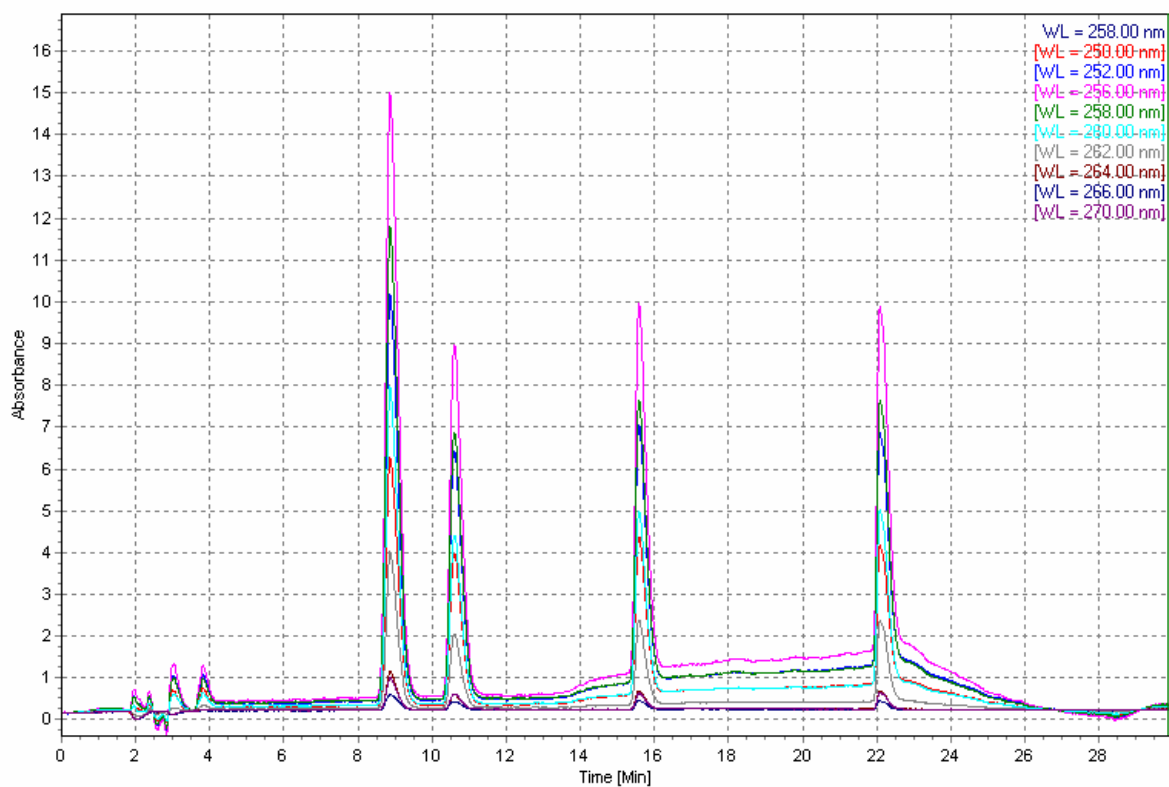


(a)

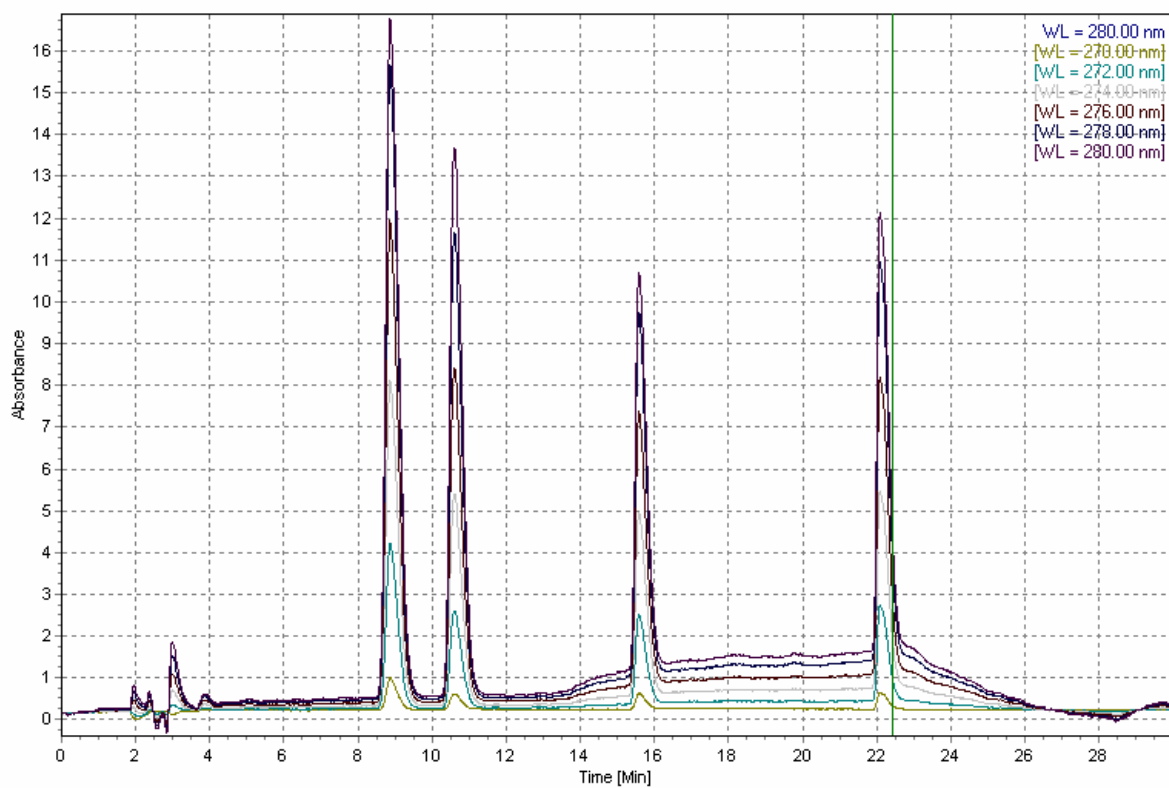


(b)

Figura 15 - Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.



(a)



(b)

Figura 16 - Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatográfico: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm

6.2 SELEÇÃO DA COLUNA

Para se obter uma melhor separação cromatográfica foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas duas colunas analíticas, uma com fase C_8 (mais polar), e com uma coluna C_{18} (menos polar). Com ambas as colunas obteve-se uma boa resolução e boa separação dos compostos de interesse. A Figura 17 mostra uma sobreposição dos cromatogramas resultantes da injeção da mistura dos padrões em concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Selecionou-se a coluna C_{18} em função dos maiores valores de áreas dos picos das sulfonamidas, confirmando-se os dados encontrados na literatura que citam maior utilização da coluna C_{18} .

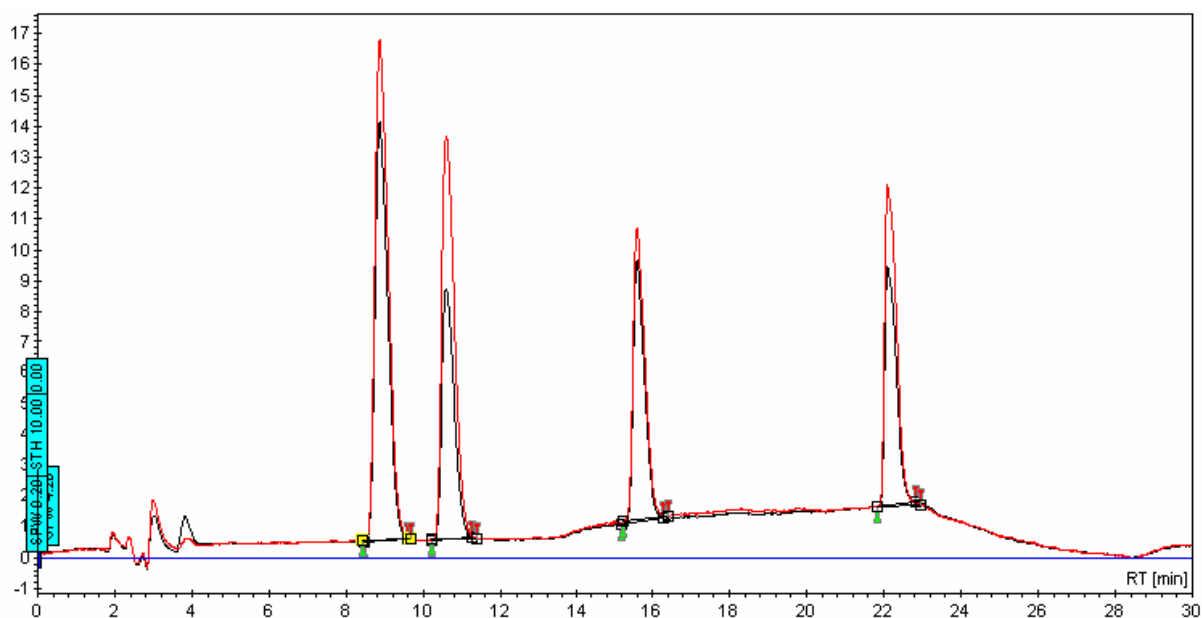


Figura 17 - Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando C_{18} (cromatograma vermelho), C_8 (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).

6.3 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é muito importante na separação dos analitos devido à interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a proporcionar uma resolução adequada dos analitos, boa separação, menores tempos de

retenção, mantendo, entretanto, a solubilidade dos analitos no decorrer da separação cromatográfica e, principalmente, sem interferir na detecção dos analitos de interesse.

6.3.1 Seleção do pH da fase móvel

As sulfonamidas estudadas apresentam caráter anfótero (solubilidade entre 1 e 192 mg/100mL de água a 27°C) e valores de pK_a entre 6,21 e 7,45. Vários trabalhos na literatura apontam o uso de solução-tampão de acetato de sódio (pH 4,5) na fase móvel, justificando que seu uso mantém as espécies iônicas estáveis no decorrer das análises. A escolha do pH da solução-tampão constitui-se, então, em um fator importante. Foram feitos testes para verificar em qual pH as sulfonamidas estudadas teriam a melhor resposta no detector DAD. Os valores de pH testados foram: 3,5; 4,5 e 5,5, como apresentado na Figura 18. Para a realização dos testes de pH utilizou-se acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Em todos os valores de pH obteve-se boa separação e resolução. Entretanto, em pH 4,5 melhores resultados foram obtidos, quando se comparando as áreas dos picos nos três valores de pH.

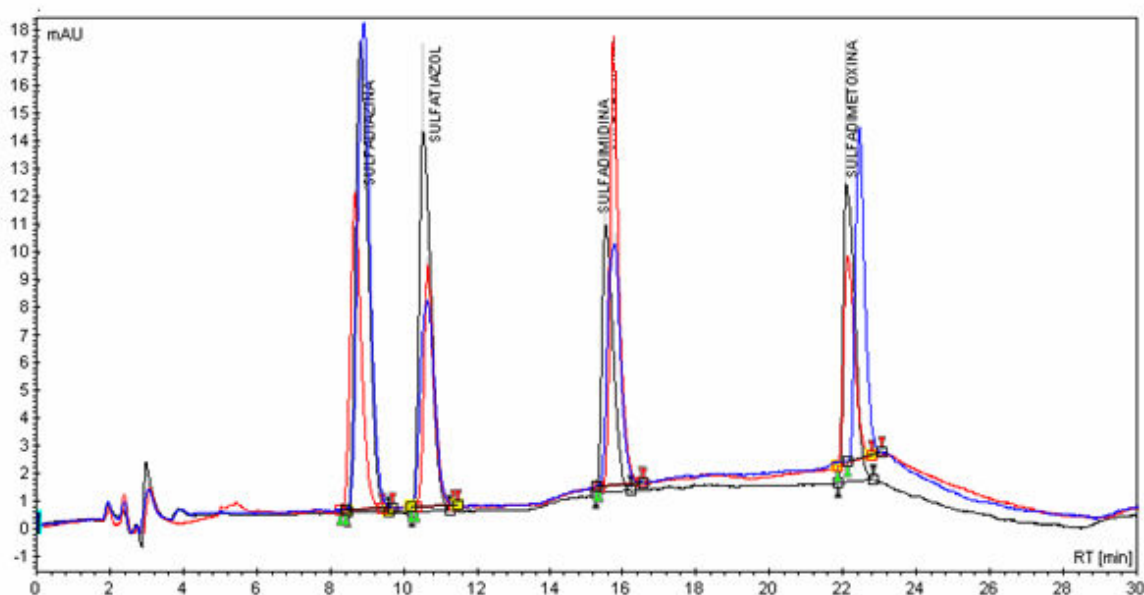


Figura 18 - Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto)

6.3.2 Composição da fase móvel

No Quadro 4 são apresentados os testes realizados no estudo da composição da fase móvel.

Teste	Gradiente			Composição da Fase móvel	
	t (min)	%	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
Teste 1	0	10:90	1,0	Metanol	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 2	0	10:90	1,0	Metanol	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 3	0	10:90	1,0	Metanol	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 4	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 5	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 6	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			

*t – tempo em minutos; % - proporção de solvente

Quadro 4 - Testes para seleção da composição da fase móvel

Quando metanol foi empregado na fase móvel, independente da composição da fase aquosa, não foi possível observar todos os picos das sulfonamidas injetadas. Em todos os

testes em que foi utilizado este solvente, observou-se somente os picos da sulfadiazina, sulfatiazol e sulfadimidina, não sendo identificando sinal para sulfadimetoxina. Este fato pode ser explicado em função do poder de arraste do metanol, que não deve ter sido suficiente para detectá-la nas condições estabelecidas. Os resultados dos testes feitos com tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e solução de ácido acético 0,1% apresentaram áreas dos picos maiores que as obtidas quando utilizando água na fase móvel. Na Tabela 7 são apresentados a quantidade e os respectivos compostos separados no estudo da composição da fase móvel. Os cromatogramas típicos obtidos com os melhores resultados para cada teste de composição da fase móvel são apresentados nas Figuras 19, a e b.

Para os testes empregando-se acetonitrila, melhores resultados foram encontrados para todas as composições da fase móvel. Utilizando-se ACN: solução de ácido acético 0,1% e ACN: tampão acetato de sódio pH 4,5, resolução e separação adequadas foram observadas para as quatro sulfonamidas. Acetonitrila e água apresentaram melhores resultados sendo, assim, selecionados como os solventes adequados para a fase móvel (Figura 19 - b).

No ANEXO 03, são apresentados todos os cromatogramas dos testes realizados nos estudos da composição da fase móvel.

Tabela 7 – Estudo da composição da fase móvel.

Teste	Quantidade de compostos separados	Compostos separados
01 (MeOH:H ₂ O)	03	SDZ, STZ, SDD
02 (MeOH:TAMPÃO)	03	SDZ, STZ, SDD
03 (MeOH:ÁGUA ÁC 0,1%)	03	SDZ, STZ, SDD
04 (ACN:H ₂ O)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
05 (ACN:TAMPÃO)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
06 (ACN: ÁGUA ÁC 0,1%)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM

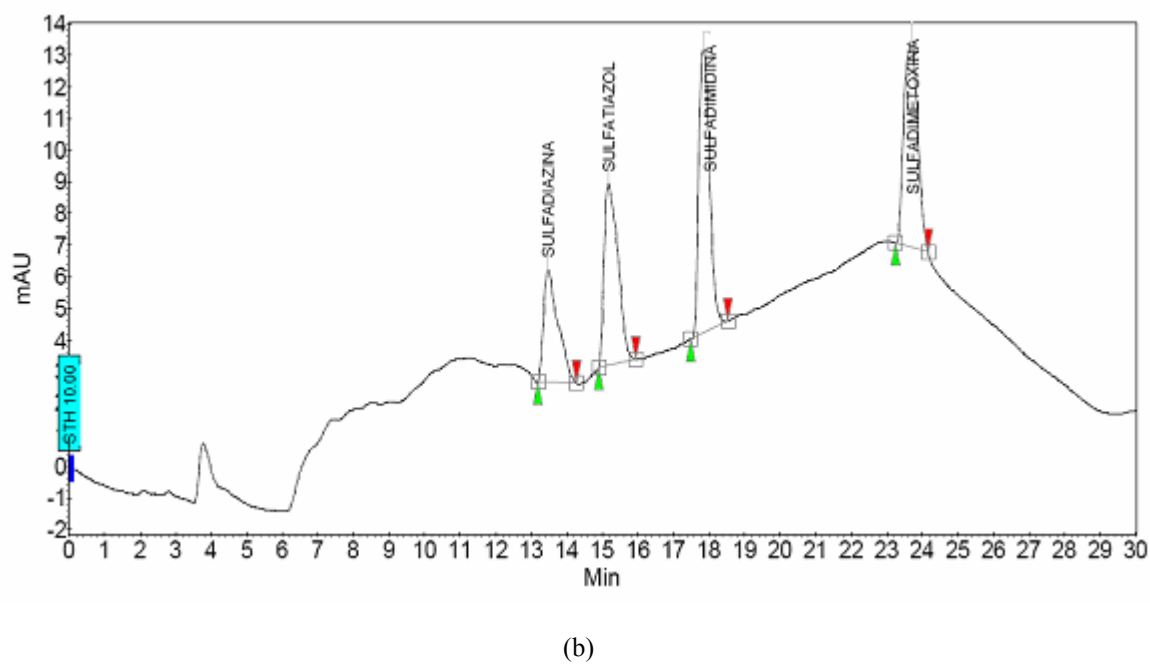
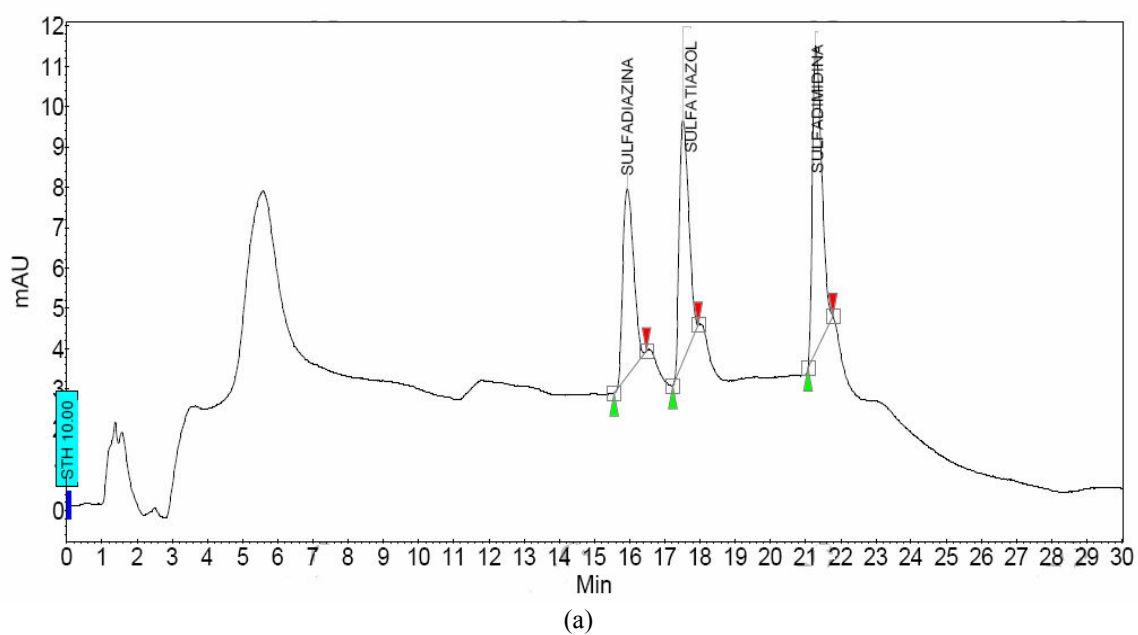


Figura 19 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água

6.3.3 Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho

As sulfonamidas são compostos ligeiramente solúveis em água, e apresentam maior solubilidade em soluções ácidas ou básicas e em solventes orgânicos [9]. Segundo Sun *et al.* [9], a solução de ácido acético 0,1% quando utilizada como solvente para as soluções de trabalho, proporciona picos cromatográficos mais definidos. Para Pecorelli *et al* [18], as soluções de trabalho devem ser preparadas usando-se solução tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, uma vez que favorecem a estabilidade das sulfonamidas.

Para se obter resolução e separação cromatográfica adequadas foram testados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho. Dois testes foram realizados, utilizando-se solução-tampão de acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e utilizando-se solução de ácido acético 0,1%. Para ambos os solventes foram obtidos resultados satisfatórios, entretanto, a solução tampão (Figura 20) forneceu maiores áreas dos picos cromatográficos, tendo-se optado por este solvente para a realização das demais análises.

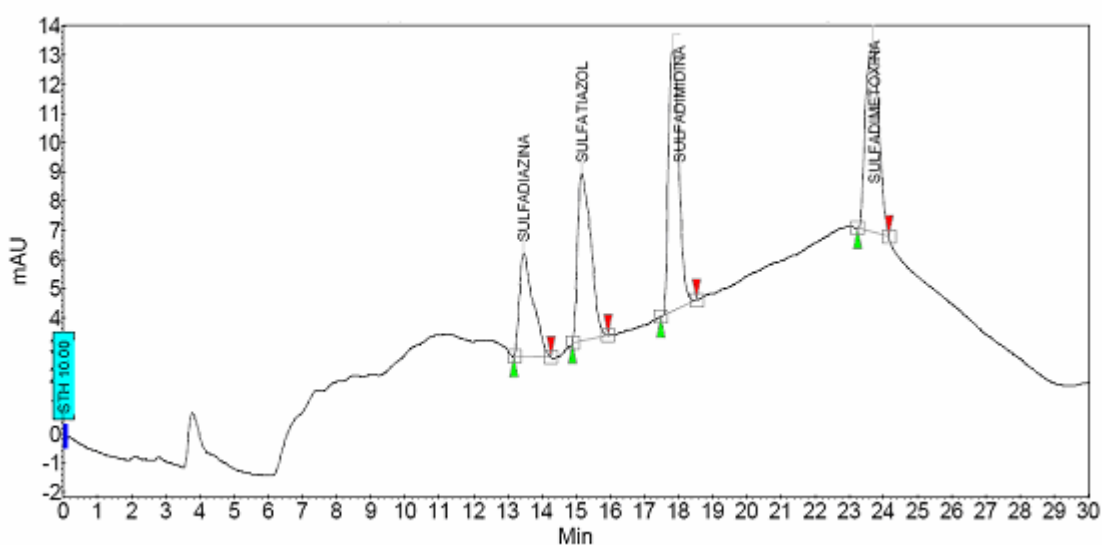


Figura 20 - Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5.

Outro teste realizado foi a otimização do tempo de análise. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação e a resolução dos picos, o fluxo da fase móvel foi variado de $0,4$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados demonstraram que quanto menor o fluxo da fase móvel sulfadiazina e sulfathiazol apresentam tempos de retenção bem próximos dificultando a

separação dos picos. Em fluxos maiores ocorre uma melhor separação. O fluxo de 1 mL min⁻¹, apresentou os melhores resultados podendo-se observar separação dos picos satisfatória.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Depois de selecionadas as condições cromatográficas foram realizados cinco repetições em concentração 1,0 mg L⁻¹ para cada sulfonamida, com os melhores resultados dos testes anteriores. Na Tabela 8 são listadas as condições cromatográficas selecionadas. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 8 - Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.

Item	Condições
Equipamento	CLAE-DAD
Coluna	CL-18, 150mm x 4,6mm, 4µm - Phenomenex
Coluna de Guarda	KJO-4282 – Phenomenex
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Água
Proporção dos solventes	10:90
(A:B)	15:85
	30:70
	40:60
	15:85
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	278 nm

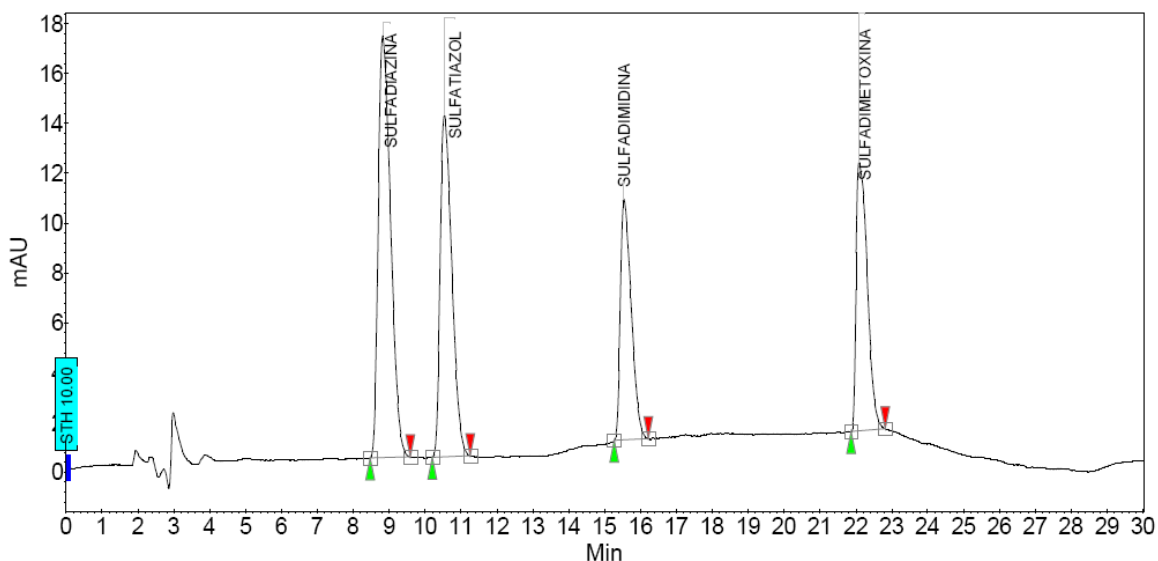


Figura 21 - Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

A estabilidade dos padrões também foi avaliada nesta etapa. A avaliação da estabilidade das soluções intermediárias utilizadas na metodologia analítica foi realizada com o objetivo de verificar a ocorrência de degradação do analito. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos padrões durante a estocagem a -10°C em um período de 3 meses. As amostras foram analisadas após 1 semana, 1, 2 e 3 meses. Definiu-se como critério de aceitação variações menores que 20% em relação à concentração inicial, levando-se em consideração possíveis alterações ocasionadas pelo próprio armazenamento.

Verificou-se que a estabilidade dos padrões é mantida por até 3 meses e 7 dias, após esse período a concentração dos padrões sofre uma perda média do analito de aproximadamente 40 %. A Figura 22 apresenta um gráfico com a percentagem de degradação das soluções-padrão.

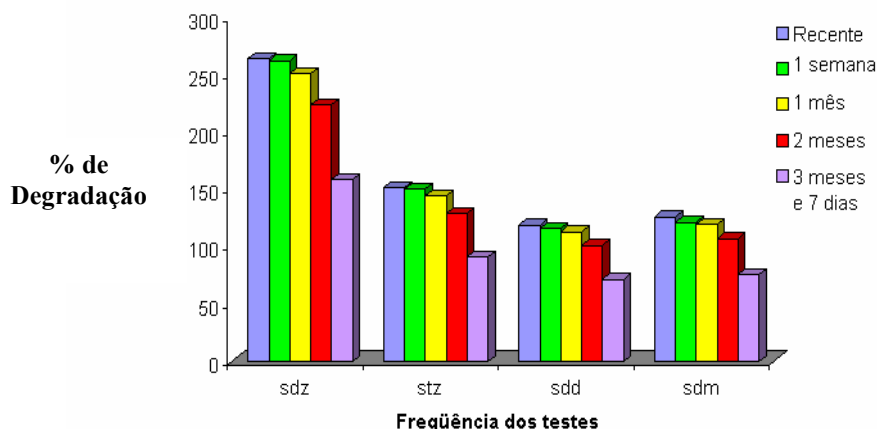


Figura 22- Estudo da degradação das soluções-padrão

6.5 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS

A metodologia de extração utilizada neste trabalho baseou-se em estudos de; SUN *et al.* [9]; BISWAS *et al.* [71]; WANG *et al.* [67]; ZOTOU e VASILADOU [11]; MAUDENS, ZHANG E LAMBERT [63]; PECORELLI *et al.* [18]; MARTEL e ZEGANNE [64]; PANG *et al.* [65]; CANCHO-GRANDE *et al.* [116]; FURUSAWA [14]; STOEV & MICHAILOVA [80]; VIÑAZ *et al.* [86]; HORIE *et al.* [66].

Os testes foram realizados utilizando-se extrato de mel, preparado pela diluição de 1,0 g de mel em água + solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (amostra sem hidrólise ácida) e extrato hidrolisado de mel (1,0 g de mel + solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}). Foram utilizados volumes de 100,0 mL de amostras fortificadas com as sulfonamidas de interesse. Para os testes preliminares utilizou-se nível de fortificação de 50 ng g^{-1} de cada sulfonamida. A extração foi realizada em triplicata e as injeções cromatográficas também foram feitas em triplicata. Avaliou-se a recuperação de cada composto após os procedimentos de extração, comparando-se com a injeção, direta dos padrões das sulfonamidas. Uma vez estabelecidas as condições, novos testes foram realizados, utilizando-se três níveis de fortificação (25 , 50 e 100 ng g^{-1}).

6.5.1 Pré-tratamento da amostra

Em síntese, podemos definir o mel como um produto açucarado, constituído em sua maioria por açúcares. As sulfonamidas têm como característica formarem ligações com açúcares, principalmente ligações com açúcares redutores, podendo formar uma variedade de diferentes compostos açúcar-sulfonamida [114] o que poderia modificar o comportamento dos picos cromatográficos pelo efeito de matriz. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre açúcar e sulfonamida, estudada por Sheth *et al.* [114]. No citado estudo, realizou-se uma reação de uma molécula de sulfatiazol com uma molécula de açúcar redutor, ocorrendo a formação de uma base de Schiff (n-glucosilamina) e liberação de uma molécula de água, formando-se em seguida um composto de Amadori e, após um longo período de armazenamento, o autor comenta a possibilidade de formação de outros produtos da reação de Maillard. O referido autor cita também que sobre condições ácidas a tendência é a formação de sulfonamidas livres devido a ionização do grupo amina. O autor ainda afirma que a ligação de açúcares-sulfatiazol poderá ocorrer com outras sulfonamidas também.

Schwaiger e Schuch [115] estudaram e provaram que para a determinação de sulfonamidas em mel é necessário uma etapa de hidrólise ácida antes da análise cromatográfica para quebrar as ligações açúcar-sulfonamida. Observaram também que após a hidrólise ácida é necessário realizar um ajuste no pH do meio para 4,5 para que as sulfonamidas permaneçam estáveis no meio.

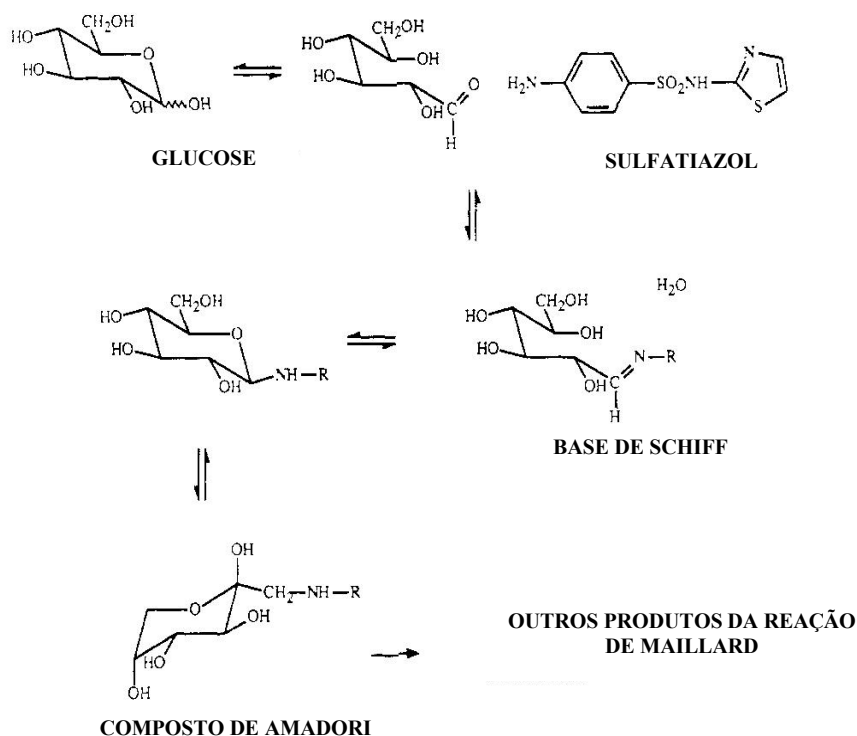


Figura 23 – Esquema da reação açúcar-sulfonamida.
Fonte: adaptado de [114].

Inicialmente foram realizados testes para selecionar as melhores condições para o pré-tratamento da amostra. Na Tabela 9 são apresentados os testes realizados.

Tabela 9 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

Após definidas as condições para a hidrólise foram realizados dois testes com a matriz. O primeiro consistiu somente na diluição de 1,0 g de mel em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5, neste caso não utilizou-se hidrólise ácida. O segundo teste consistiu na realização de uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico, como descrito na seção 5.3.2.1. Os resultados dos testes de hidrólise mostraram que as variáveis que mais influenciam na eficiência da hidrólise ácida são concentração e volume de ácido adicionado e tempo de agitação. A forma de agitação influencia, mas não como as outras variáveis. A concentração do ácido mostrou ser uma variável muito importante, sendo a concentração de 2M a mais eficiente. O volume de ácido adicionado influencia tanto na dissolução quanto na eficiência da hidrólise. O tempo de agitação também está diretamente ligado à eficiência da hidrólise. O conjunto de condições: concentração de 2M e tempo de 30 minutos, apresentou bons resultados, mas não melhores dos que os apresentados na mesma concentração e tempo de 45 minutos.

Das condições estudadas, os melhores resultados foram os obtidos pelo seguinte conjunto: concentração de 2M, 2 mL de ácido e 45 min. O volume de 2 mL propiciou melhores resultados, no entanto, dificulta a dissolução do mel, tendo-se optado pela adição de volume de 5 mL. A agitação em banho ultra-som foi escolhida por apresentar resultados um pouco melhores do que os encontrados com o uso da mesa agitadora. Nas Figuras 24 - a e b, são apresentados os cromatogramas correspondentes a este teste. Pode-se observar através das Figuras que sem hidrólise do mel ocorreram muitos ruídos, porém a evidência mais importante é que não foram observados os picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas de interesse. Na amostra testemunha fortificada foram observados vários picos interferentes em tempos de retenção próximos aos dos picos das sulfonamidas de interesse. A

ocorrência destes picos cromatográficos pode ocasionar diminuição nas áreas dos picos cromatográficos das sulfonamidas de interesse o que pode levar a resultados errados. Na Figura 24 b é apresentado um cromatograma típico de uma amostra de testemunha fortificada sem passar por uma etapa de hidrólise ácida.

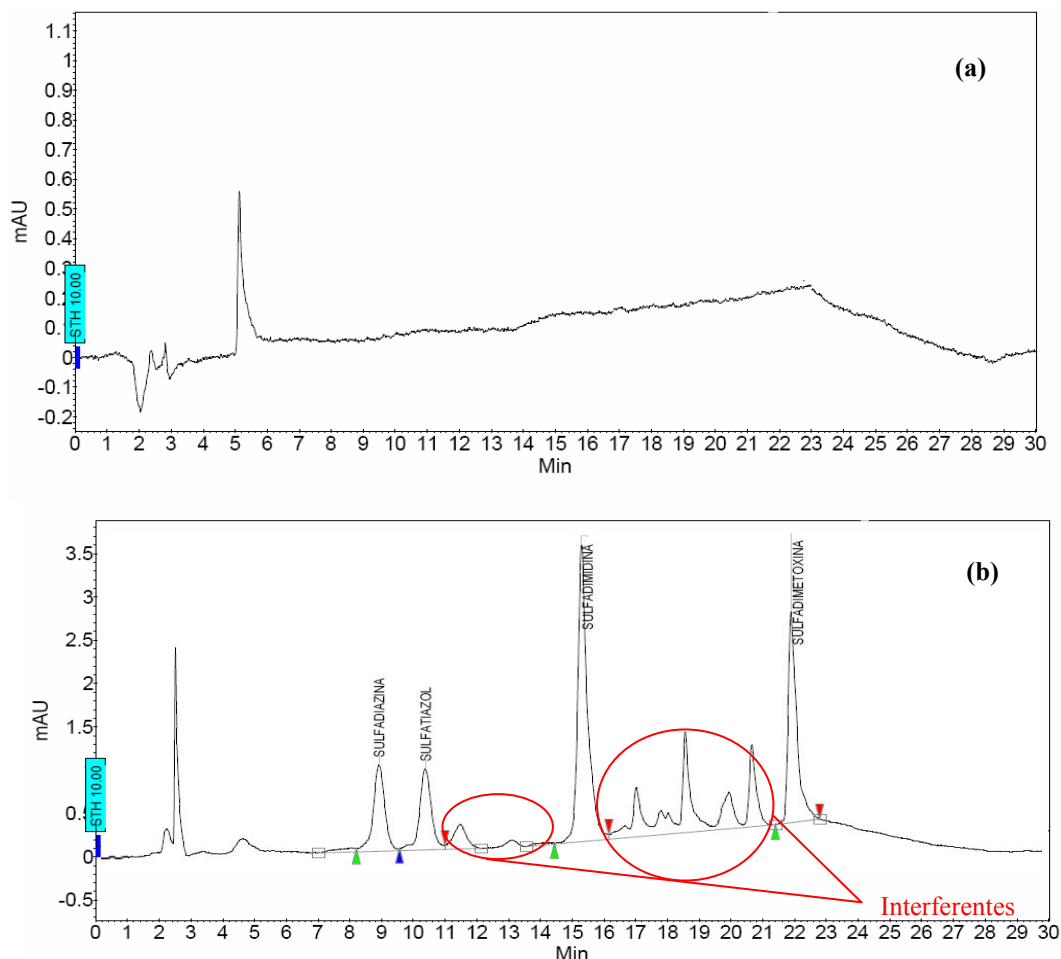


Figura 24 - Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹, sem hidrólise ácida.

De um modo geral, todos os testes de hidrólise mostraram-se etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. Para o mel submetido à etapa de hidrólise ácida, foi possível perceber melhora do ruído no cromatograma, não sendo também observados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Os melhores resultados são mostrados nas Figuras 25 - a e b.

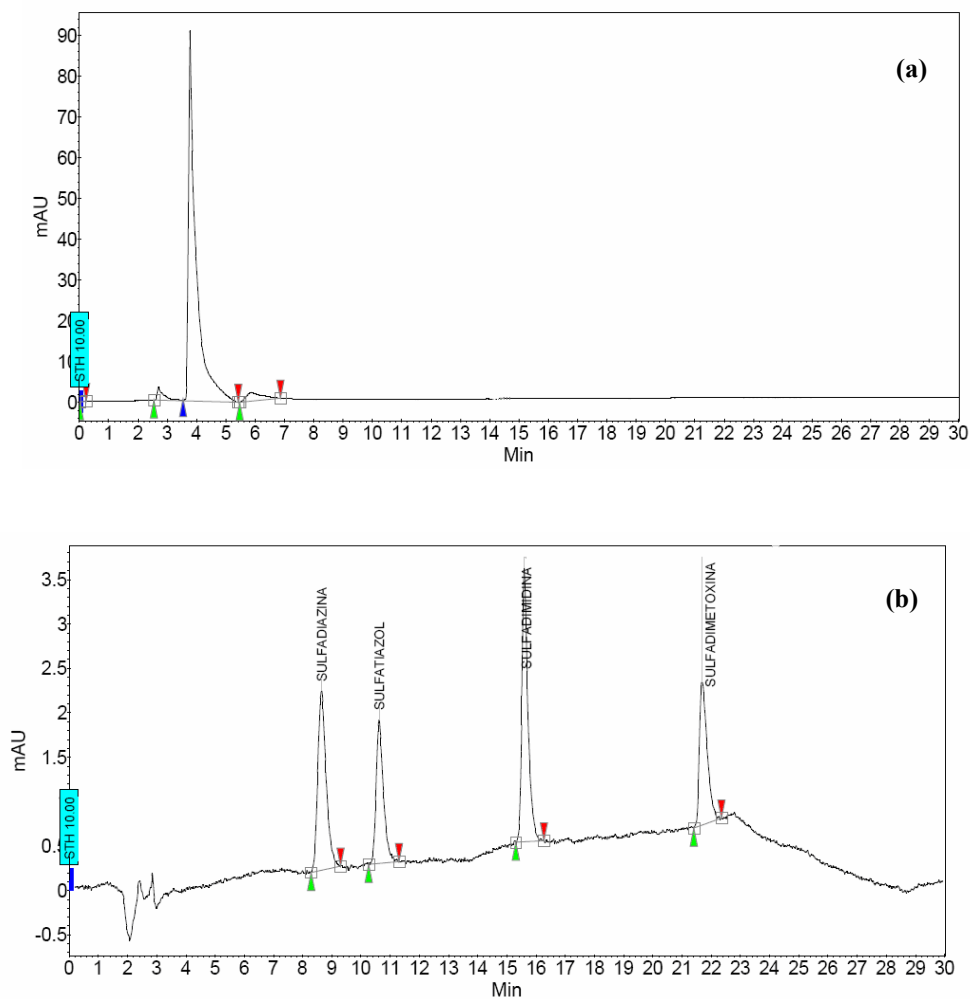


Figura 25 - Cromatogramas obtidos nos testes de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , com hidrólise ácida.

Pode-se evidenciar por este estudo a importância da etapa de hidrólise ácida, observando-se no cromatograma sem hidrólise a presença de vários picos interferentes próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, o que levou a uma redução das áreas dos picos dos compostos. Com a amostra de mel submetida à hidrólise ácida o cromatograma quase não evidenciou interferentes, tendo apresentado separação adequada dos picos das sulfonamidas.

6.5.2 Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração por fase sólida

Os testes realizados para escolha do adsorvente, solvente para condicionamento do cartucho e solvente para eluição tiveram por objetivo escolher o conjunto de condições que oferecessem a melhor eficiência na extração, ou seja, os melhores resultados de recuperação. As recuperações obtidas na extração de compostos nos níveis de concentração estudados deve ser entre 70-120%. As fases e condições utilizadas nas extrações são citadas na Tabela 10.

Cabe mencionar, que a eficiência da extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na amostra de mel fortificada em relação ao analito em solução padrão.

Tabela 10 - Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)

Teste	Cartucho	Condicionamento
Teste 1	C-8	MA/MAT/AA/AAT*
Teste 2	C-18	MA/MAT/AA/AAT
Teste 3	Nexus	MA/MAT/AA/AAT

***MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.**

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos testes de eficiência de extração. Quando metanol foi utilizado como solvente de eluição recuperações inferiores a 70% foram obtidas.

Tabela 11 - Resultados dos testes de eficiência de extração

Analito	Eluente	Eficiência da extração (% de recuperação)											
		C8 (teste 1)				C18 (teste 2)				Nexus (teste 3)			
		MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT
SDZ	MeOH	42	41	49	48	53	64	56	60	57	60	62	65
	ACN	61	67	65	70	66	70	68	73	73	79	80	84
	Tampão	58	62	61	62	67	73	70	76	73	77	79	83
STZ	MeOH	39	45	40	48	55	51	51	56	51	58	56	59
	ACN	56	60	55	65	62	64	63	71	60	67	75	84
	Tampão	51	60	55	60	55	63	66	70	62	66	68	76
SDD	MeOH	42	45	44	47	55	61	64	63	53	60	53	63
	ACN	60	65	62	66	63	68	67	66	72	76	74	79
	Tampão	62	64	63	57	66	72	74	68	64	69	70	78
SDM	MeOH	43	47	42	45	51	59	54	61	55	58	52	61
	ACN	60	63	62	67	70	64	67	63	73	76	66	79
	Tampão	55	58	56	58	72	75	74	78	71	74	78	82

Analisando-se os resultados da Tabela 11, observa-se que os cartuchos Nexus proporcionaram recuperações, de 51 a 65%, em todos os tipos de condicionamento realizados. Para os cartuchos C18, as recuperações variaram entre 51-64%. Com cartucho C8 menores recuperações foram obtidas de 41-49%, supondo-se problemas com a polaridade da fase.

Dos condicionamentos testados, os solventes acetonitrila/água/tampão foram os que apresentaram melhores resultados para todos os cartuchos. A utilização de tampão no condicionamento proporcionou melhores resultados. Os solventes metanol/água foram a sequência que apresentaram menores valores de recuperação.

Para a eluição, verificou-se que, com acetonitrila, as recuperações foram melhores dos que as obtidas quando metanol foi utilizado como solvente de eluição dos analitos. As recuperações encontradas foram de 51-84%. Analisando-se os resultados dos testes utilizando-se acetonitrila como eluente, observou-se que com cartuchos Nexus, melhores recuperações foram também obtidas (60-84%). O cartucho C18 também apresentou resultados satisfatórios (62 a 73%). Para o cartucho C8, menores recuperações (55-70%) foram obtidas.

As extrações utilizando tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹), pH 4,5 e adição de 1% de metanol como eluente para os analitos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com acetonitrila. As recuperações para os cartuchos Nexus foram de 62-83%. Já

para o cartucho C18 foram de 55-79% e para o cartucho C8 as recuperações foram de 51-62%.

Com base nos resultados encontrados, quanto ao material que constitui a fase sólida do cartucho, pode-se observar que o cartucho Nexus apresentou uma maior interação com as moléculas dos analitos dos que as fases sólidas C8 e C18 obtendo-se melhores resultados em todos os testes. Os resultados dos testes realizados com os cartuchos C8 não foram satisfatórios para nenhuma das condições testadas. Pressupõe-se que a polaridade da fase possa ter interferido na extração. E como eluente a acetonitrila apresentou os melhores resultados, incluindo secagem mais rápida sob fluxo suave de nitrogênio.

Objetivando-se promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes também foram realizados dois testes de *clean-up*, ambos utilizando-se cartuchos de *Florisil*, 500 mg/6mL. O primeiro teste (*clean-up* 1) foi realizado com 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila e o segundo teste (*clean-up* 2) foi realizado com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após a passagem das amostras pelos cartuchos de *Florisil*, submeteu-se a fluxo suave de nitrogênio até a secura. As amostras foram retomadas com 1 mL de acetonitrila e injetadas. A Figura 26 apresenta os resultados dos testes de % de recuperação das quatro sulfonamidas estudadas com as duas condições de *clean-up* testadas.

Dentre os procedimentos empregados, o que demonstrou maior recuperação do analito foi o que empregou 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila. No entanto, estes resultados não foram melhores do que os obtidos quando não realizado procedimento de *clean up* com cartuchos de *Florisil*, optando-se, portanto pela não utilização deste passo nas demais análises para a determinação de sulfonamidas em mel.

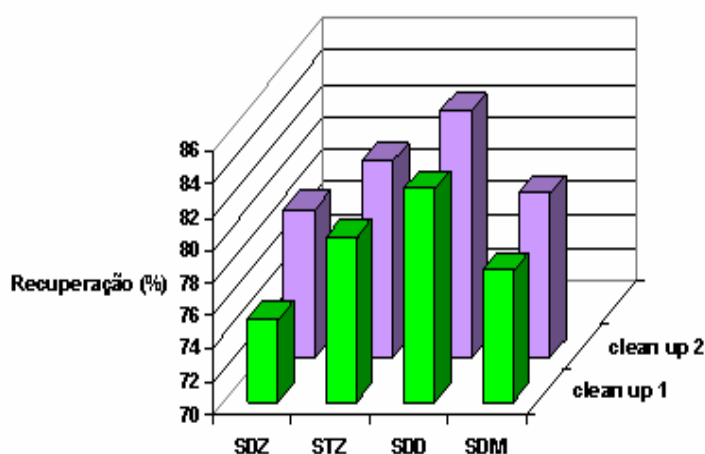


Figura 26 - Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de *clean-up*.

Depois de selecionadas todas as condições de extração, foram realizados novos experimentos de extração, em triplicata, em três níveis de concentração: 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para otimizar as condições de extração do método desenvolvido. Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração selecionadas.

Tabela 12 – Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.

Composto	Concentração		
	25 ng/g	50 ng/g	100 ng/g
SDZ			
Rec±RSD, (%)	80 ± 12,50	83 ± 8,43	85 ± 5,88
STZ			
Rec±RSD, (%)	71 ± 15,49	76 ± 11,84	80 ± 7,50
SDD			
Rec±RSD, (%)	77 ± 12,99	81 ± 9,88	83 ± 6,02
SDM			
Rec±RSD, (%)	75 ± 13,33	79 ± 10,13	81 ± 6,17

*n=3

Na Figura 27 é apresentado o cromatograma no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹ obtido após estabelecimento das condições de extração.

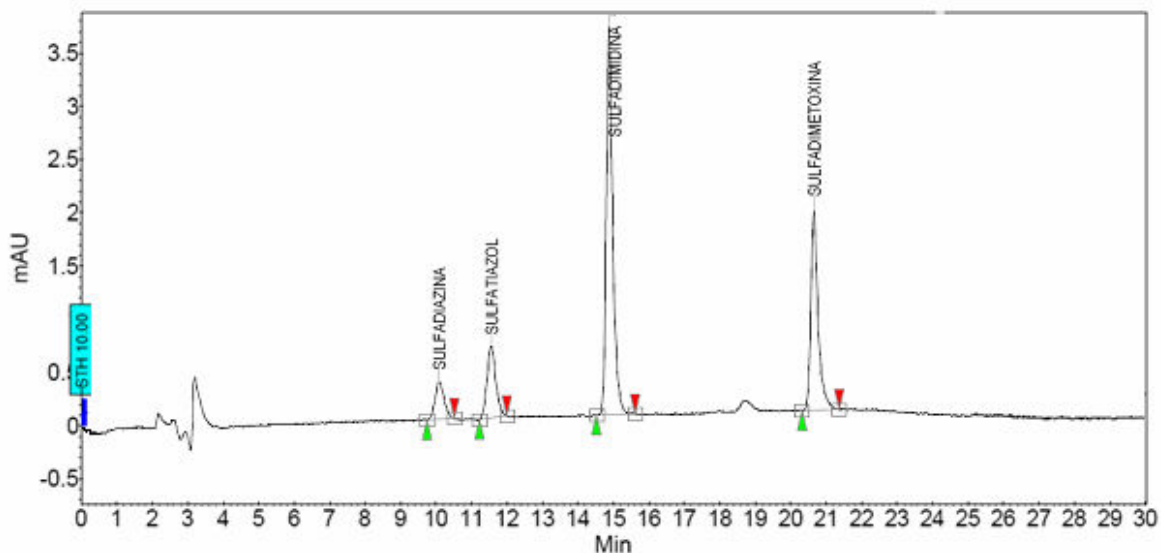


Figura 27 - Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas e otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica, como no preparo da amostra para a determinação das sulfonamidas por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de sulfonamidas no mel. Antes da validação, verificou-se a conformidade do sistema seguindo as recomendações da *Food and Drug Administration* – FDA, 2004.

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

6.6.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros da conformidade do sistema avaliados: número de pratos (N), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As), estão de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas vigentes e foram obtidos satisfatoriamente. Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos dos parâmetros para verificação da conformidade do sistema cromatográfico.

Tabela 13 - Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico

Sulfonamidas	t _R	N	k	Rs ^(*)	As
SDZ	8,45	8002,23	1,6	3,0	1,04
STZ	10,33	8710,16	2,8	6,74	1,25
SMZ	15,24	12014,63	3,4	8,44	1,20
SDM	22,09	26853,47	4,0	11,41	1,00

t_R – tempo de retenção das sulfonamidas; N – número de pratos teóricos; k – fator de retenção; Rs – resolução; As – fator de assimetria

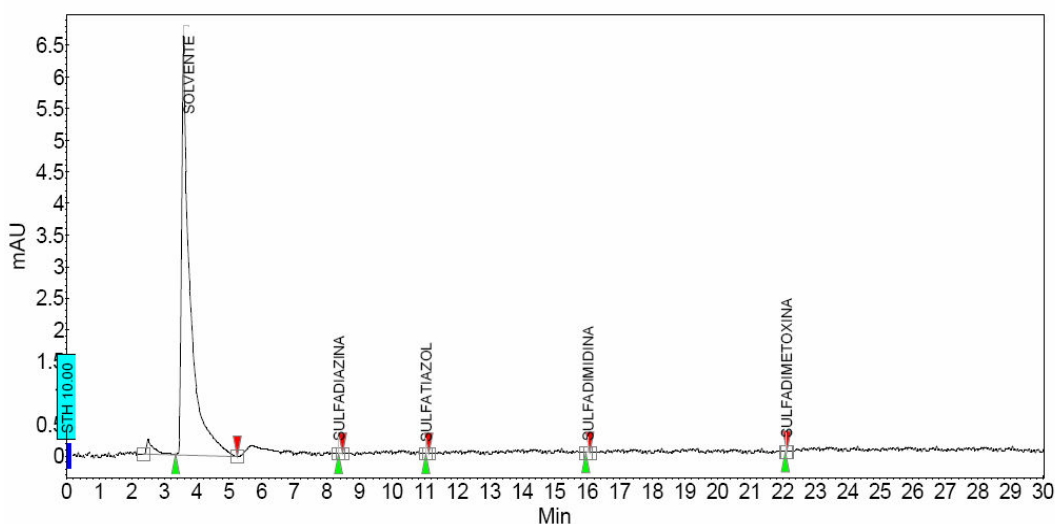
(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes.

Considerando-se as condições citadas por SHABIR [113]: $1 \leq k \leq 10$; $Rs > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

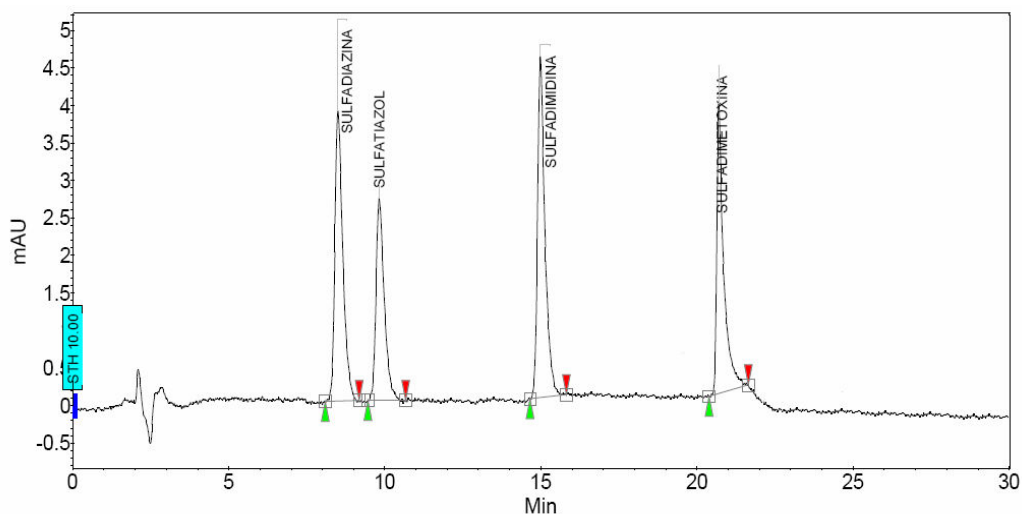
6.6.2 Seletividade

O estudo da seletividade do método teve como objetivo quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no mel. A seletividade foi testada analisando-se o extrato da amostra testemunha (extrato contendo só mel) e o extrato da amostra testemunha fortificado com as sulfonamidas (extrato contendo mel fortificado com as sulfonamidas).

No extrato da amostra testemunha não foram observados picos interferentes referentes aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, durante toda a separação cromatográfica. Foram observados apenas sinais característicos do solvente. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28 - a e b.



(a)



(b)

Figura 28 - Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.

Segundo a ANVISA não são recomendados que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito sejam superiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Como verificado na Figura 31, não existem picos interferentes, conclui-se, portanto, que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

6.6.3 Curva analítica

Foram construídas curvas analíticas, com soluções-padrão. As curvas analíticas com os padrões foram feitas com cinco injeções sucessivas (em quintuplicata), de cada ponto das curvas (25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$), sempre da menor para a maior concentração, sendo utilizada a média das leituras para a construção das curvas.

As curvas foram construídas plotando-se a área do pico *versus* a concentração do analito (Figura 29), onde y é a resposta em unidades de área e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

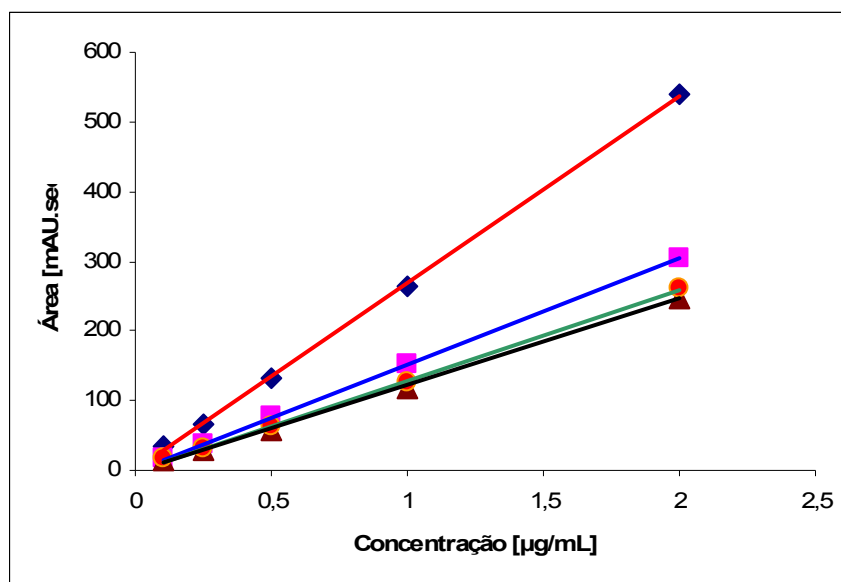


Figura 29 – Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).

Os valores das leituras foram submetidos a tratamentos estatísticos para obtenção dos coeficientes de correlação (r^2) e as equações das retas de cada sulfonamida pela extrapolação dos dados com o uso do *software Origin 6.0* e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão

Sulfa	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação de regressão	Coeficiente de correlação (r^2)
SDZ	0,025-2,0	$3,5754x - 0,021$	0.9990
STZ	0,025-2,0	$2,9936x - 0,043$	0.9996
SDD	0,025-2,0	$2,3462x - 0,019$	0.9994
SDM	0,025-2,0	$2,2321x - 0,063$	0.9983

Os coeficientes de correlação encontrados, todos superiores a 0,9900, demonstraram que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração estudado. Os resultados encontrados estão de acordo com as recomendações da ANVISA [58] para a validação de métodos analíticos.

6.6.4 Faixa linear, linearidade, sensibilidade

Para todo método existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,9900. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

A linearidade da resposta foi determinada através da habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear.

A sensibilidade foi estudada como a resposta do detector em função da concentração do analito, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

6.6.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das soluções-padrão das sulfonamidas em concentração decrescentes. Os limites de

detecção e quantificação foram calculados através das relações sinal/ruído. Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação.

6.6.6 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g⁻¹). O nível de fortificação utilizado nesta pesquisa baseou-se no LMR estabelecido pelo PNCR, do MAPA.

Tabela 15 - Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SDM
Faixa linear (µg mL ⁻¹)	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0
Sensibilidade (µau mL µg ⁻¹)	-0,021	- 0,043	-0,019	-0,063
Linearidade (r ²)	0.9990	0.9996	0.9994	0.9983
Precisão intra-ensaio (%RSD) n=5	2,84	5,24	4,31	3,01
Precisão inter-ensaio (%RSD) n=5				
25 ng g ⁻¹	12,99	11,11	12,65	10,81
50 ng g ⁻¹	5,81	8,64	7,14	6,02
100 ng g ⁻¹	3,41	4,88	3,49	3,57
LD (ng mL ⁻¹)	20	25	30	30
LQ (ng mL ⁻¹)	66	75	90	90

6.6.6.1 Precisão

Segundo o INMETRO [95] a precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Nesta pesquisa a precisão intra-ensaio foi avaliada mediante a análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, de duas amostras de mel fortificadas até a concentração de 100 ng g^{-1} . O RSD para todas as sulfonamidas ficou na faixa de 2,84 a 5,81% (Tabela 15). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de mel fortificadas em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}) em três dias diferentes, em quintuplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todas as sulfonamidas foi na faixa de 3,41 a 12,99% (Tabela 15).

Para a ANVISA [58] os intervalos de desvio padrão relativo (RSD) são considerados adequados se valores até 20% forem encontrados. Como todos os valores de RSD mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto pode ser considerado preciso.

6.6.6.2 Exatidão

A exatidão é medida com relação ao quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra [104], representado pelos valores das recuperações.

Foram realizados dois testes de recuperação, um utilizando apenas um nível de fortificação (100 ng g^{-1}) e um outro utilizando três níveis de fortificação (25, 50 e 100 ng g^{-1}). Para os testes de recuperação realizados em um mesmo dia, mesmo equipamento e mesmo analista, as recuperações variaram na faixa de 83 a 89,3%, estes resultados se encontram de acordo com os valores estipulados pela ANVISA [58], confirmando a exatidão do método.

As recuperações médias das sulfonamidas nos três níveis de fortificação avaliados de 74 a 88 %. Os menores valores de recuperação foram obtidos para o menor nível de fortificação, 25 ng g^{-1} , sendo de 72% e, proporcionalmente, a melhor recuperação foi encontrada para o maior nível de fortificação, 100 ng g^{-1} (88%). Dentre as quatro sulfonamidas estudadas, a sulfadiazina foi a que apresentou os melhores resultados em todos os níveis de fortificação (77, 86 e 88%, respectivamente).

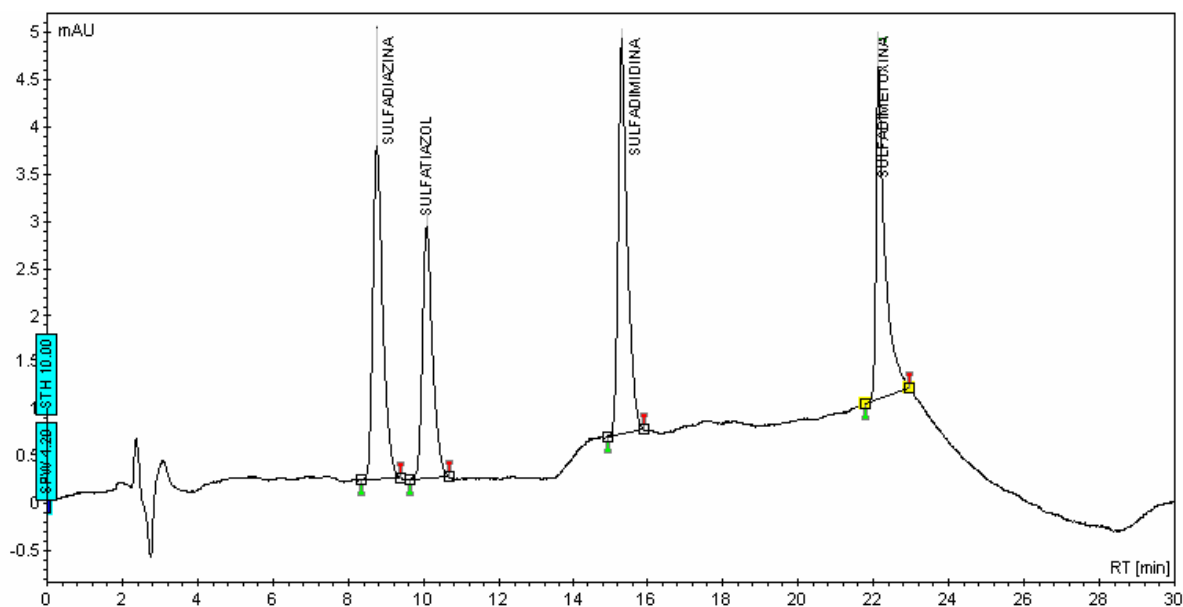


Figura 30 - Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹.

Os valores das recuperações das sulfonamidas obtidos nos três níveis ensaiados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.

Sulfa	Nível (ng g ⁻¹)	RM (%)	t _{calc}
SDZ	25	77	-1,05
	50	86	-1,40
	100	88	-2,00
STZ	25	72	-1,64
	50	81	-1,05
	100	82	-2,25
SDD	25	79	-1,05
	50	84	-1,14
	100	86	-2,33
SDM	25	74	-1,62
	50	82	-1,80
	100	84	-2,67

RM (%)= média das recuperações; t_{calc}= teste “t” de *Student* calculado

6.6.6.3 Avaliação estatística do método

Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student de significância. Na Tabela 16 são apresentados os resultados com as médias das recuperações percentuais relativas (RM%) obtidas para 5 (n-1) repetições e o t calculado para 95% do intervalo de confiança ($t_{95\%}$) do método aplicado.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados menores que o valor tabelado, $t_{tab}=2,78$, (Quadro 02 – ANEXO 2). Deste modo, aparentemente não existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), podendo-se considerar o método exato.

6.7 ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

O método proposto após ser desenvolvido e validado, foi utilizado para estimar a concentração das quatro sulfonamidas de interesse nesta pesquisa em amostras comerciais de mel provenientes do Estado do Maranhão e de estados vizinhos como o Piauí e Tocantins. Todas as amostras foram coletas no período de setembro de 2007 a março de 2008. Na Tabela 17 são apresentados o número de amostras, as cidades de coleta e suas respectivas codificações.

O objetivo destas análises foi aplicar o método desenvolvido, não realizando, portanto, um controle de qualidade mais completo nas amostras utilizadas, para o qual seriam necessárias mais amostras e aplicação de procedimentos de amostragem e coleta específicos para tal fim.

Tabela 17 – Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.

Estado	Cidade	Nº de amostras	Código
Maranhão	São Luís	01	MA1
	Santa Luzia do Paruá	01	MA2
Piauí	Teresina	01	PI
Tocantins	Paraíso	01	TO1
	Barrolândia	01	TO2

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da aplicação do método nas amostras de comerciais de mel.

Tabela 18 – Análise das amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.

Composto	Quantidade média (ng g ⁻¹) em amostras de mel, n=3				
	MA1	MA2	PI	TO1	TO2
SDZ	nd*	nd	nd	nd	nd
STZ	nd	nd	nd	nd	nd
SDD	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado, aplicando o LD de 20 ng g⁻¹ e LMR de 100 ng g⁻¹.

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os cromatogramas das amostras de méis de Santa Luzia do Paruá, São Luís, Tocantins e Piauí analisadas utilizando-se o método proposto.

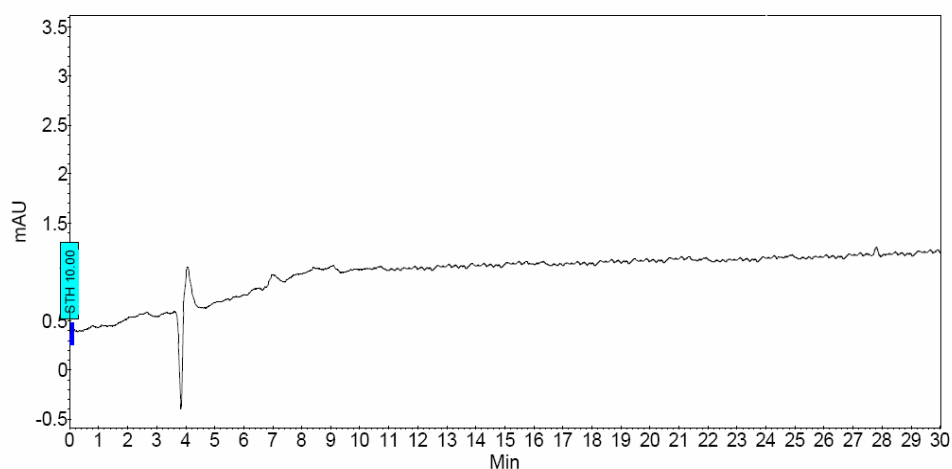


Figura 31 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá.

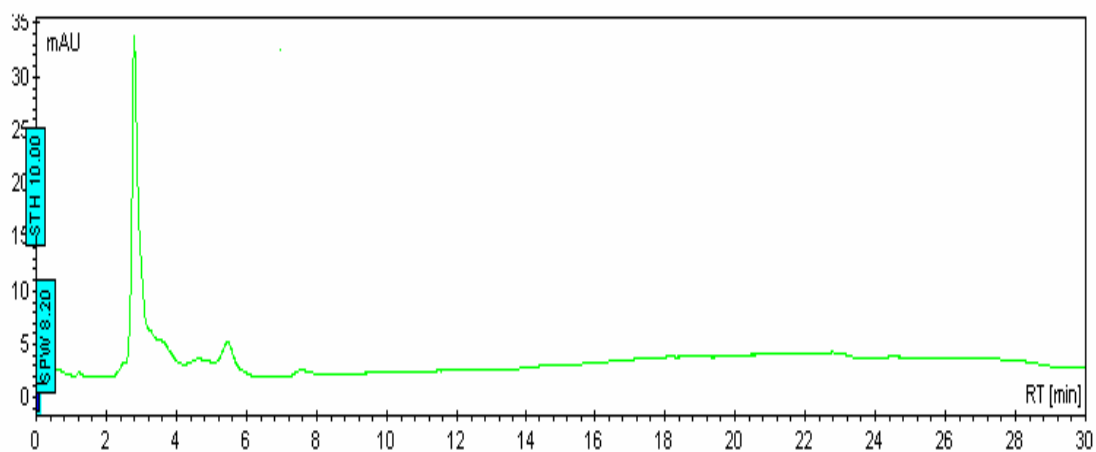


Figura 32 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.

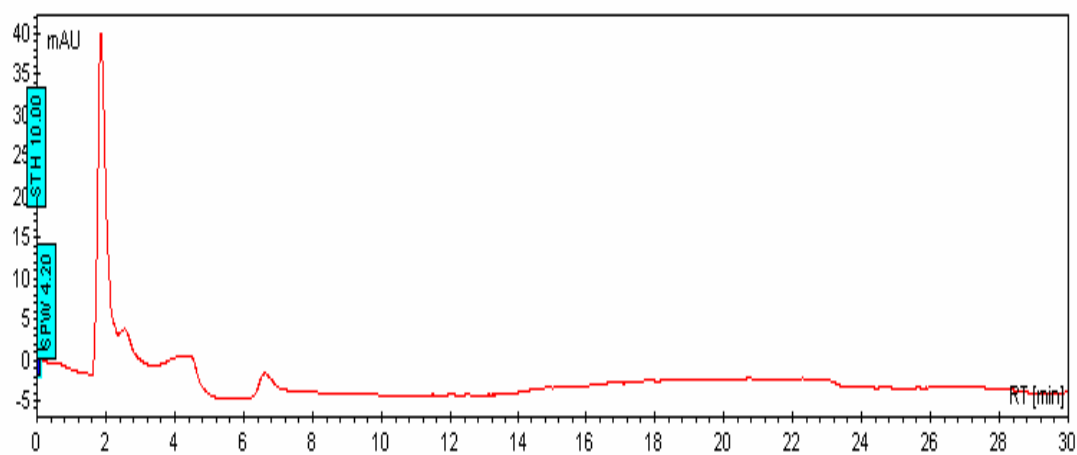


Figura 33 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins

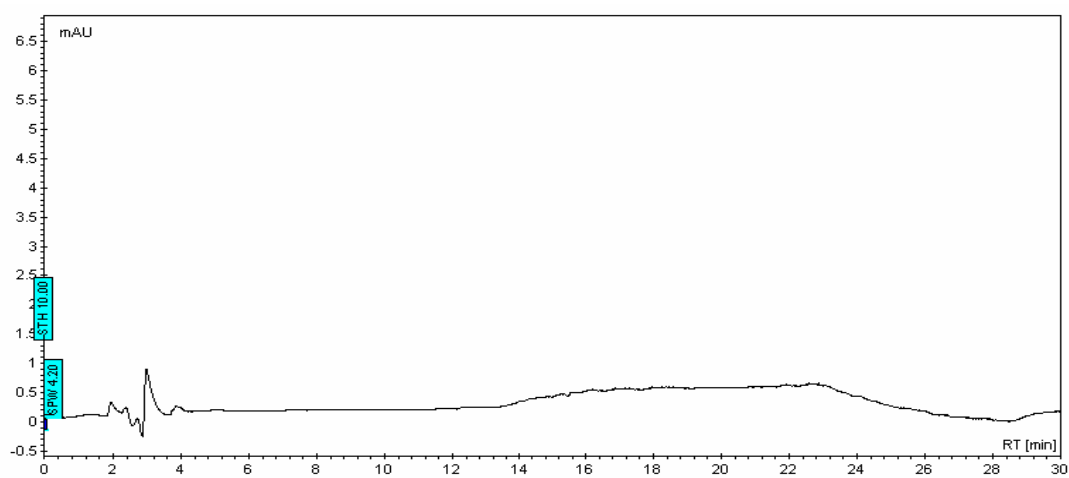


Figura 34 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí

Verifica-se pelas Figuras 31, 32, 33 e 34 que não há presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, indicando que as amostras estão livres de contaminação por resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina. Também não foram verificados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas nas outras amostras comerciais de mel estudadas.

7. CONCLUSÕES



7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel. O procedimento proposto foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato nas condições estabelecidas. Considerando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sulfonamidas ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), os limites de detecção e quantificação do CLAE-DAD apresentaram-se adequados para a análise de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel foi o preparo da amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realizou a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes.

A parte do trabalho relacionada aos estudos de pré-tratamento da amostra, ou seja, a etapa de hidrólise ácida mostrou-se eficiente para a redução do número de interferentes.

Os estudos de recuperação mostraram que para a extração de sulfonamidas em mel os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos Nexus. Foram realizados testes de recuperações em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}). As recuperações médias obtidas após otimização do método variaram de 72 a 88%, e os coeficientes de variação variaram de 2,84 a 12,99%.

Foi verificado que as amostras de mel coletadas e analisadas não apresentaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina, fato este que serve como indício da qualidade do mel produzido na Região Norte e Nordeste.

8. REFERÊNCIAS



8. REFERÊNCIAS

- [1] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000.
- [3] SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia – Relatório Completo**. Série Mercado. 2006.
- [4] PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. **Mel: Câmbio e Embargo Europeu podem prejudicar exportações em 2006**. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.4. abril/2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>> Acesso em: 19 de março de 2007.
- [5] SHIMANUKI, H. Bacteria. In: Flottum, K. (Ed.), **Honey Bee Pests, Predators, and Disease**, third ed. pp. 33–54, Medina, Ohio. 1997.
- [6] SCHWARTZ, D.P.; SHERMA, J.. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.72, 1986.
- [7] SHERMA, J.; BRETSCHNEIDER, W.; DITTAMO, M.; DIBIASE, N.; HUH, D.; SCWARTZ, J.P. **Journal of Chromatography**. v.463, p.229, 1989.
- [8] NEIDERT, E; BARANIAK, Z.; SAUVE, A. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.641, 1986.
- [9] SUN, H.; AI, L.; WANG, F. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. **Chromatographia**, v.66, N. 5/6, p.333-337, setembro, 2007.
- [10] FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M. de S.; SANTOS, J.G.R. dos; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTANA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.80-82, 2007.

- [11] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p.307-311, 2006.
- [12] GALLINA, A.; BENETTI, C.; BIANCOTTO, G.; BAGGIO, A.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; MUTINELLI, F. Antibiotics residues in honey: validation procedure. **APIACTA**, V.40, P.45-49, 2005.
- [13] ZAYAS-BLANCO, F. de; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatography separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, p.375-378, 2004.
- [14] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.
- [15] AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 3531-3539, 1990.
- [16] SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 875-879, 1990.
- [17] GARCÍA, J.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; ALDAMA, J.M. Validation of an analytical method to determine sulfamides in kidney by HPLC-DAD and PARAFAC 2 with first-order derivate chromatograms. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p. 222-234, 2007.
- [18] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European UNION REGULATION 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.23-29, 2004.
- [19] KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxyl/ N^4 -acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues and eggs. **Talanta**, v.67, p.54-58, 2005.

- [20] QUINTANA-RIZZO, J.; SALTER, R.S.; SAUL, S.J. Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin honey. **APIACTA**, V.40, P.55-62, 2005.
- [21] FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. **Chromatographia**, v.57, N. 5/6, p.317-320, 2003.
- [22] HAMMEL, Y.A; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.H.; GUY, P.A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p.58-76, 2008.
- [23] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.
- [24] MOHAMED, R.; HAMMEL, Y.-A.; LeBRETON, M.-H; TABET, J.-C.; JULLIEN, L.; GUY, P.A. Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1160, p.194-205, 2007.
- [25] LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.72, p.1082-1087, 2007.
- [26] KISHIDA, K. Quantitation and confirmatory of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, v.18, p.301-305, 2007.
- [27] BATT, A.L.; SNOW, D.D.; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, p.1963-1971, 2006.

- [28] PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, p.225-232, 2006.
- [29] KERR, W. E. **Papel das abelhas sociais na Amazônia**. Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente. (Florianópolis – SC - Brasil). 119-129. 1979.
- [30] SEBRAE, Apicultura brasileira – Produção Nacional. Disponível em : <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/IBGE.pdf> Acesso: 07 fev. 2008.
- [31] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2003 – 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1 Acesso em 23 ago, 2007.
- [32] SODRÉ, G. da S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA - APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [33] CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985, 226p.
- [34] NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [35] NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/storyhoney.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [36] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.
- [37] CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura - 01).
- [38] HOOPER, T. Guia do apicultor. [S.1]: Publicações Europ-América, p. 223-266, 1976.

- [39] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [40] SHIMANUKI, H., KNOX, D.A. Susceptibility of *Bacillus* larvae to Terramycin. **American Bee Journal**. 134, 125–126. 1994.
- [41] HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., KERSTERS, K., DEVOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N., AND BERKELEY, R. C. W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ahs *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.46, 270–279. 1996.
- [42] ALIPPI, A. M., ALBO, G. N., LENIZ, D., RIVERA, I., ZANELLI, M., AND ROCA, A. E. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control of American foulbrood in honey bees. **J. Apic. Res.** v.38, 149–158. 1999.
- [43] SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**. v.313, 1072–1077. 2006.
- [44] NESTLÉ. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS, Disponível em: www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?download=M3wBPgDB/8ull6Du36WenojQ1NTTjaXZnqWfVpzLhmf> Acesso em: 05 jul. 2007.
- [45] PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- [46] GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.

- [47] FELI, M.A.F. Antibacterianos – Sulfonamidas. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/sulfonamidas2007.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- [48] MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.
- [49] WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 23, n. 4, p.362-384, abril, 2006.
- [50] MERCK, The Merck Index—**An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, Merck, Rahway, NJ, 1989.
- [51] WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.40, ISSUE 7, p. 723-730, abril, 2000.
- [52] MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Campinas-SP, 2007. 197p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. III - Universidade Estadual de Campinas.
- [53] QIANG, Z.; ADAMS, C. Potenciometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**. v.38, ISSUE 7, p.723-730, abril, 2000.
- [54] COMBS, M.T.; KHORASSANI, M.A.; TAYLOR, L.T. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight sulfonamides. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p.301-308, 1999.
- [55] O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 297-319, 1998.

[56] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[57] BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999. Disponível em: <

www.dgv.min-agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório%202006%20divulgação.pdf

> Acesso em: 22 de março de 2007.

[58] ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.

[59] DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. **In: Antimicrobials in foods**. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.

[60] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLMÍ, C.; CURINI, R. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4614-4624, 2004.

[61] MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid-chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85-92, 2004.

[62] MARTEL, A.-C.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, N. 6, p.953-961, 2003.

[63] 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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p.534-541, 2003.

[64] HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, N. 5, p.786-789, 1992.

- [65] WANG, Z.; ZHANG, S.; DING, S.; EREMIN, S.A.; SHEN, J. Simultaneous determination of sulphamethazine and sulphadiazine in a new monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay. **Food Additives e Contaminants**. v.25, p.574-582, maio, 2008.
- [66] TAMOSUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. Comparison of LC and UPLC Coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. **Chromatographia**. v.67, p. 783-788, set, 2008.
- [67] GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A M.M.; RABONE, F.; SALERMO, A.G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 116-119, jan, 2008.
- [68] ZOU, Q.-H; WANG, J.; WANG, X.-F; LIU, Y.; HAN, J.; hou, f.; xie, m.-x. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal AOAC International**, v.91, p.252-257, jan, 2008.
- [69] BISWAS, A.K.; RAO, G.S.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MALIK, J.K. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8845-8850, 2007.
- [70] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.
- [71] LAMBA, S.; SANGHI, S.K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.110-115, 2005.
- [72] PANG, G.-F.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; JIA, G.-Q; FAN, C.-L.; LI, X.-M.; LIU, Y.-M.; LI, Z.-Y.; SHI, Y.-Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.88, p.1304-1311, maio, 2005.

- [73] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p.259-264, 2005.
- [74] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSA, J.; SNIEGOCKI, T.; GRZEBALSKA, A. Sulfonamides residues in honey. Control and Development of Analytical Procedure. **APIACTA**, v. 38, p.249-256, 2003.
- [75] REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**, V.38, P.23-30, 2003.
- [76] POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p.111-117, 2002.
- [77] HELLER, D.N.; NGOH, M.A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M.H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.39-52, 2002.
- [78] STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamides residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p.37-42, 2000.
- [79] ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 898, p.95-102, 2000.
- [80] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.

- [81] HEERING, W.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAVER, E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v.123, p.2759-2762, 1998.
- [82] GEHRING, T.A; RUSHING, L.G.; CHURCHWELL, M.I.; DOERGE, D.R.; McERLANE, K.M.; THOMPSON JR, H.C. Determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 44, N. 10, 3164-3169, 1996.
- [83] 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, p.1457-1461, outubro, 1996.
- [84] VIÑAZ, P.; ERROZ, C.L.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescent derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.726, 1995.
- [85] PATHY, M. Trace analysis of sulfaquinoxaline in animal tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Vol. 275, 115-125, 1983.
- [86] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation technique for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.36-53, 2007.
- [87] LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, p.1-35, 2004.
- [88] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.68-76, 2001.
- [89] ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos – SP. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2006.

- [90] TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean up procedures and selective detectors. **Journal Chromatography A**, v.823, p.137-146, 1996.
- [91] QUEIROZ, S. C. N.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- [92] MAJORS, R. E. **LC-CG Supplement**. v.8, *maio*, 1998.
- [93] IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba – PR. p.134. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [94] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. **Química Nova**, v.27, n.5, set./out., 2004.
- [95] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ – CGCRE – 008**, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> Acesso em: 24 maio 2007.
- [96] BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.
- [97] RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. Campinas-SP, 96p. Dissertação (mestrado) - Unicamp, 2004.
- [98] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.
- [99] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. London, 1995. Q2A

(CPMP/ICH/381/95). Disponível em: www.eudra.org/emea.html. Acesso em 11 de fev. 2008.

[100] THOMPSON, M.; ELISSON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure App. Chem.**, v.74, p.835-855, 2002.

[101] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals**. Expert Consultation, 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 11 fev. 2008.

[102] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

[103] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

[104] LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76p.

[105] HUBERT, P. et al The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

[106] USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776- 1777, 1995.

[107] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em 26 de out. 2007.

[108] BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

[109] EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods**. Brussels: EUROPEAN COMMISSION, 2004. SANCO/825/00. rev.7. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf>.

Acesso em: 11 fev. 2008.

[110] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora, 2001.

[111] IBGE, Cidades - Prefeituras e Municípios 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>> Acesso em: 23 maio 2008.

[112] GOOGLE EARTH. Disponível em: <www.google.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

[113] SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

[114] SHETH, H.B.; YAYLAYAN, V.A.; LOW, N.H.; STILES, M.E.; SPORNS, P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1125-1130, 1990.

[115] SCHWAIGER, I.; SCHUCH, R. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.** v. 96, p.93, 2000.

[116] CANCHO-GRANDE, B.; FALCÓN, M.S.G.; COMESAÑA, M.R.; GÁNDARA, J.S. Determination of sulfametazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3145-3150, jun. 2001.

[117] INMETRO - INSTITUTO DE QUALIDADE E METROLOGIA. **Expressão da Incerteza de medição**, Rio de Janeiro, Apostila, 2002.

[118] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidande: validation of chromatographic methods**. Rockville: Center for Drug Evaluation

and Research (CDER), 1994. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf. Acesso em 11 de fev. 2008.

[119] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedural Manual**. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

[120] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; SANTOS, T.C.R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p.155-168, 2002.

[121] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, jul./dez., 1994.

[122] DE AMARANTE Jr; O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, São Luís, v.12, n.1/2, p.116-131, 2001.

[123] LEITE, F. In: **Validação em Análise Química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 4^a ed., 2002.

[124] CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.10.

[125] COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp. Campinas, 170 p., 1998.

[126] MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; DIEZ, M.M.; GARCÍA, M.C.M.; GIL, D.B.; CAÑADA-CAÑADA, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in Money simples. **Talanta**, v.73, p.304-313, 2007.

[127] THOMPSON, T.S.; PERNAL, S.F.; NOOT, D.K.; MELATHOPOULOS, A.P.; VAN DEN HEEVER, J.P. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.304-311, 2007.

- [128] LI, H.; KIJAK, P.J.; TURNIPSEED, S.B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: a multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.836, p.22-38, 2006.
- [129] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p.174-181, 2005.
- [130] THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p.168-176, 2005.
- [131] STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A Multiresidue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. **Analytica Chimica Acta**, v.547, p.262-268, 2005.
- [132] SOTO-CHINCHILA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCIA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)]oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p.60-67, 2005.
- [133] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y.-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8468-8473, setembro, 2005.
- [134] MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.64, p.87-100, 2004.

- [135] CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDERIS, B.M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta**, v.494, p.21-28, 2003.
- [136] FUH, M.R.; CHU, S.Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p.215-221, 2003.
- [137] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separations conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v. 98, p.153-158, 2003.
- [138] CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and eggs. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, N. 3, p.558-566, 2003.
- [139] REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.225-232, 2003.
- [140] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.153-158, 2003.
- [141] RHIJI, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A.; BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.121-133, 2002.
- [142] VERZEGNASSI, L.; SAVOY-PERROUD, M.-C.; STANDLE, R.H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.77-87, 2002.

- [143] FUH, M.-R.S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, p.1127-1139, 2001.
- [144] LINDSEY, M.E.; MEYER, M.; THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.73, N. 19, p.4640-4646, outubro, 2001.
- [145] NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C.; BERNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p.169-177, 2000.
- [146] DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p.1243-1247, 2000.
- [147] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [148] REEVES, V.B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.723, p.127-137, 1999.
- [149] KENNEDY, D.G.; McCRAKEN, R.J.; CANNAN, A.; HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p.77-98, 1998.
- [150] CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M.E.; DIMARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal of Chromatography B**, v. 706, p.269-277, 1998.

- [151] AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.1-40, 1995.
- [152] KRISTLANSEN, G.K.; BROCK, R. Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. **Analytical Chemistry**, v.66, N. 19, p.3253-3258, outubro, 1994.
- [153] NIESSEN, W.M.A.; USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. **Analyst**, v.119, p.2543-2548, dezembro, 1994.
- [154] PORTER, S. Confirmation of sulfonamides residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, v.119, p.2753-2756, 1994.
- [155] SHETH, H.B.; SPORNS, P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.1696-1700, 1991.
- [156] UMAGAT, H.; McGARRY, P.F.; TSCHERNE, R.J. Stability indicating sulfa drug analysis using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, N. 7, p.922-924, 1979.

9. ANEXOS



9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Quadro 01 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel – PNCR/2007.

Grupo	Analito	Matriz	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR/NA* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	Mel	CLAE/UV	25	200	7
	Oxitetraciclina (a)					
	Tetraciclina (a)					
	Sulfatiazol (b)	Mel	CLAE/UV	25	100	15
	Sulfadimetoxina (b)					
	Sulfadiazina					
	Sulfaquinoxalina					
	Sulclorpiridazina	Mel	CL/EM-EM	0,5	1(I)*	30
	Nitrofurazona – SEM					
	Furazolidona – AOZ					
	Furaltadona – AMOZ					
	Nitrofurantoina - AHD					
	Tilosina	Mel	CL/EM-EM	0,5	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	Mel	CG/EM-EM	10	10	15
	Alfa-endosulfan			10	10	
	4,4-DDE			10	10	
	4,4-DDD			10	10	
	4,4 DDT			10	10	
	Dodecacloro			10	10	
	Endrin			10	10	
	Iprodiona			50	50	
	Tetradifona			20	20	
	Captana			50	50	
	Lindane			10	10	

Fonte: BRASIL [57].

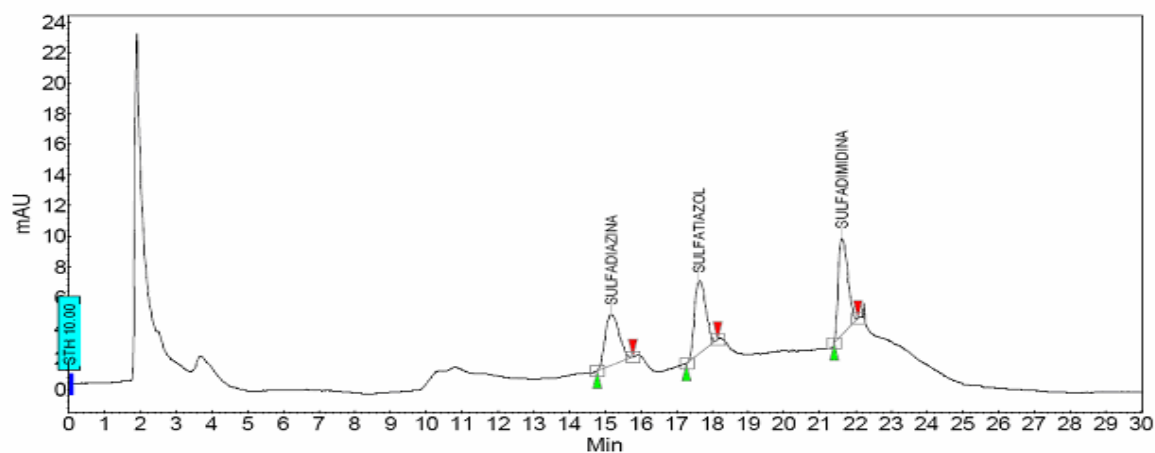
9.2 ANEXO 2

Quadro 02 – Distribuição dos valores do teste “*t*” de Student

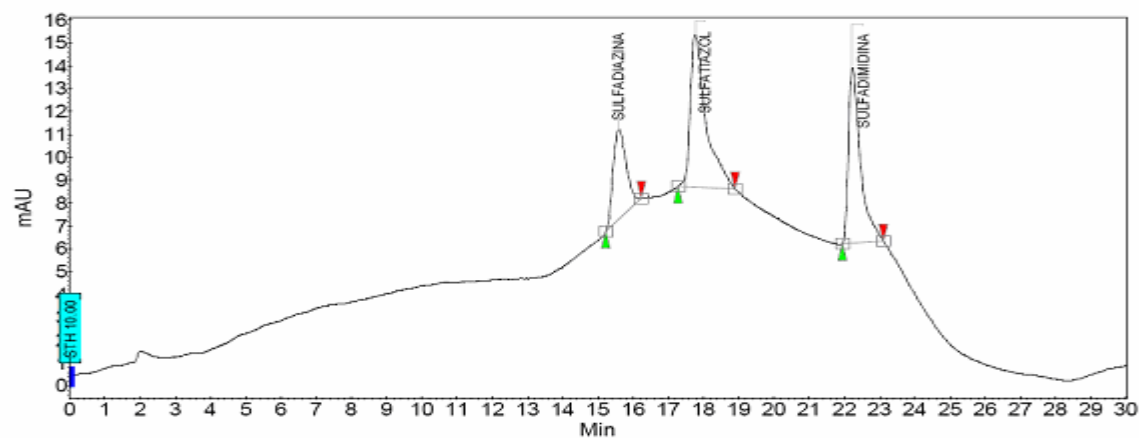
GL (n)	t _{95%}
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086

Fonte: Instituto de Qualidade e Metrologia [2002].

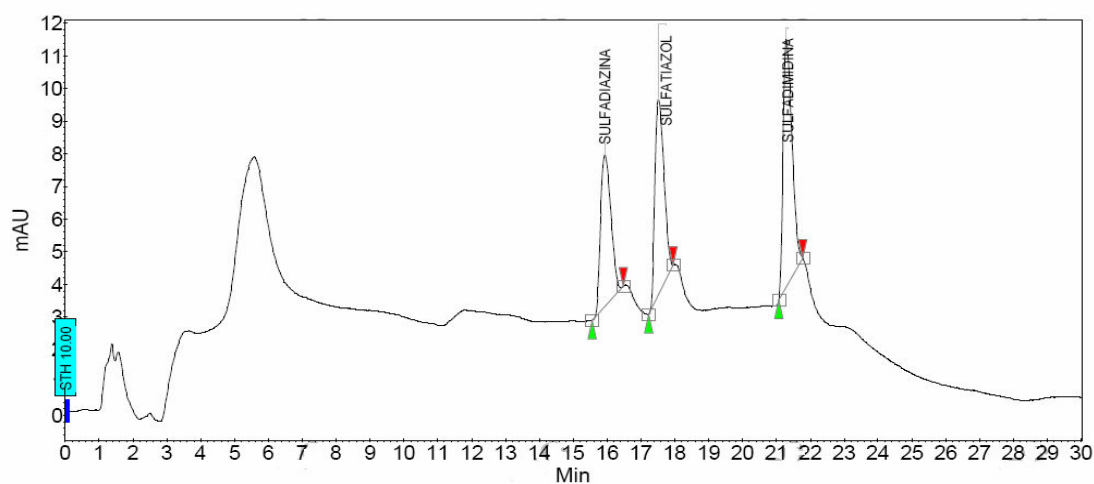
9.3 CROMATOGRAMAS DOS TESTES DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL



(a)

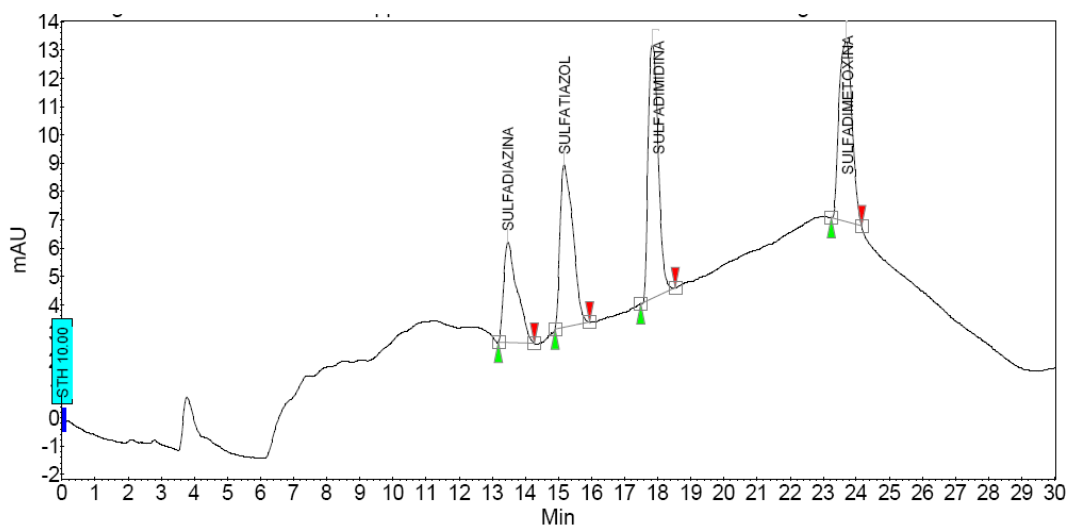


(b)

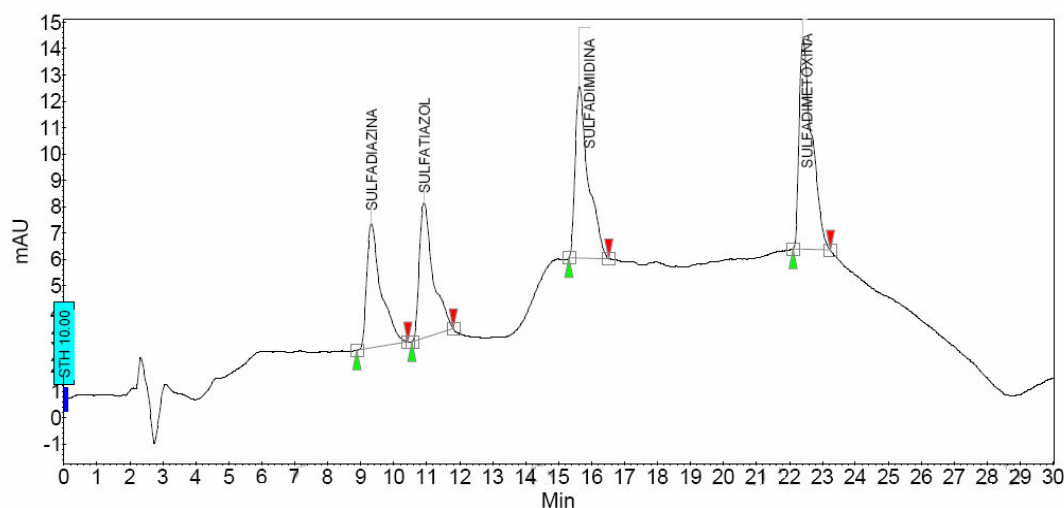


(c)

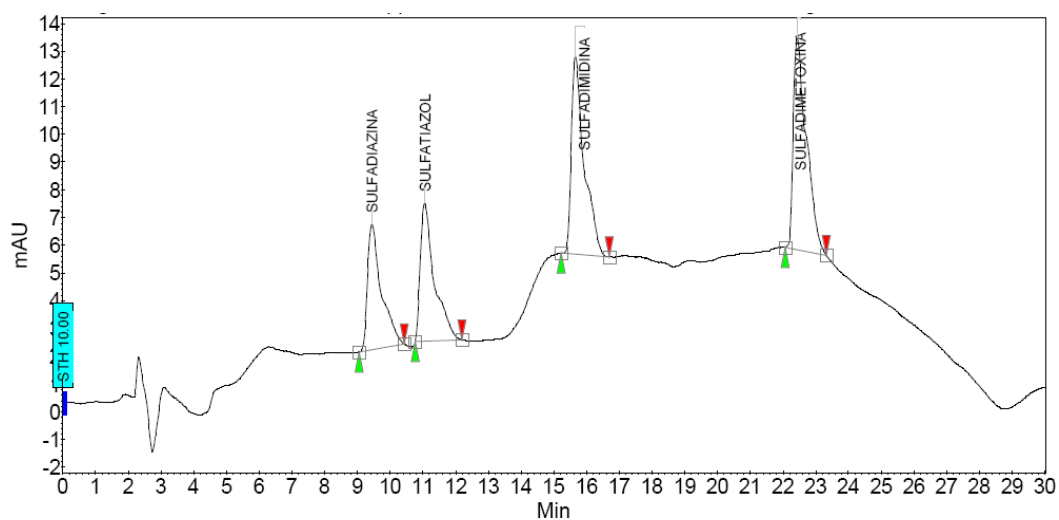
Figura 35 -Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5/Metanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 36 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

São Luís
2008

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco

São Luís
2008

Silva, Verônica Alves Gonçalves da

Desenvolvimento de metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos/ Verônica Alves Gonçalves da Silva. São Luís, 2008.

130f.

Orientador: Teresa Cristina R. dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Química. São Luís, 2008.

1. Mel – resíduos de sulfonamidas. 2. Produção de mel. 3. Extração em fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina R. dos Santos, orient. II. Título.

CDU 658.56:638.14.06

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^ª. Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco
(Orientadora)**

**Prof^º Dr. Laerte da Cunha Azeredo
(DEQUI/UFRRJ)**

**Prof^º Dr. Fernando Carvalho
(DETEQUI/UFMA)**

A Deus e a Nossa Senhora...

Aos meus pais: Maria da Penha Alves da Silva
e Êulete Gonçalves da Silva.

Ao meu amor, Fábio Silveira Vidal.

À minha sobrinha: Iracema D'monik Miranda
Gonçalves da Silva.

E ao meu irmão Fabrício C. G. da Silva.

Por todo amor, carinho e paciência.

E pelo incansável incentivo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos memoráveis, coisas inexplicáveis e pessoas inesquecíveis”.

Ao nosso Deus, Todo Poderoso, meu Mestre, meu Pastor, meu Senhor, por ter me dado coragem para superar todas as dificuldades, por nunca me desamparar!... A Nossa Senhora, que tanto me inspira, em todos os momentos, tirando-me de todas as dificuldades e levando-me a serenidade.

Aos meus pais, que me fornecem a força necessária para tudo na minha vida, por terem me educado tão bem, ensinando-me valores essenciais para ser uma boa pessoa e uma profissional consciente e de muita ética. Agradeço ao meu pai pelo exemplo de pessoa culta e a minha mãe pelo exemplo de professora dedicada. Agradeço também à valiosa lição de sempre me mostrarem que sozinhos não somos nada, mas somos muito mais com a ajuda dos amigos.

Aos meus tios, tia Cida e tio Laerte, por desde cedo me ensinarem a amar a química e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada também por me ensinarem a superar obstáculos estudando.

Ao meu noivo Fábio Silveira Vidal, que tão pacientemente ouviu todas as minhas dúvidas, afagou minhas tristezas, pelo carinho, pelo companheirismo, pelas horas que passou comigo estudando química e pelo seu generoso amor que tanto me incentivou em todas as atividades sempre acreditando que eu iria conseguir.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, por me acolher tão carinhosamente, por seu incentivo durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório NARP pela convivência.

Ao amigo, José Crediciomar pelo apoio, incentivo, paciência (para me ensinar a utilizar o equipamento (HPLC)) e pela grande demonstração de amizade.

Aos meus amigos: Gilvan, Raphael e Álvaro, amigos que fiz e aonde quer que eu vá levarei em meu coração. Agradeço a cumplicidade e agradável convívio, as conversas e os bons momentos compartilhados. Raphael te agradeço mais ainda pela grande ajuda na finalização desta pesquisa, muito obrigada meu amigo!

A querida amiga e bibliotecária, Rosivalda Pereira, pela acolhida fantástica, pelas adoráveis e produtivas conversas na biblioteca do CCET e pela grande ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

A amiga Cláudia Guerra pela convivência, pelo carinho, amizade e por ser minha família em São Luís.

Ao Prof^o José Wilson pela amizade e orientação profissional, desde a disciplina de catálise continuando seus ensinamentos por todo o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química: Marise e Daniele, aos funcionários do Departamento de Tecnologia Química: Alba, Ivaldo e de outros setores da UFMA, em especial a Dona Eunice e Senhor Alberto, pela constante disposição em me ajudar na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“A pesquisa científica consiste em
ver o que todo mundo já viu, mas
pensar em algo que ninguém pensou
ainda”.*

(Albert Szent-Györgyi)

RESUMO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável, não sendo permitido a presença de aditivos e/ou agentes conservadores. Na apicultura as sulfonamidas são muito utilizadas na prevenção e controle de doenças em colméias, como a cria pútrida americana causada pelo *Paenibacillus larvae*. Uma consequência desta prática é a presença destes resíduos no mel, o que pode causar reações alérgicas nos consumidores. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas no mel. No Brasil, a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A realização de programas de monitoramentos de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando possíveis danos à saúde do consumidor. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico multiresidual para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel de abelhas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A metodologia estabelecida consistiu nas seguintes condições: extração em fase sólida com sorvente Nexus, eluição com 5 mL de acetonitrila e reconstituição com solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, com adição de 1% de metanol, separação em coluna analítica C18, fase móvel acetonitrila e água, no modo de eluição em gradiente e detecção a 278 nm. O preparo de amostra consistiu na hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} de uma alíquota de mel e ajuste para pH 4,5 com solução tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. O método foi validado e os resultados demonstraram exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Foi encontrada boa faixa de linearidade, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 41 a 89% e estimativa do desvio padrão relativo variando entre 2,36 e 14% para os quatro compostos estudados. Os limites de detecção das quatro sulfas em amostra de mel variaram de 20 a $30 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 60 a $90 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para as concentrações totais de SDZ, STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite adequada determinação das quatro sulfas em amostras de mel de abelhas.

Palavras-chave: Sulfonamidas. CLAE-DAD. Extração por fase sólida. Validação. Mel.

ABSTRACT

Honey is a natural substance produced by bees and by your nature it is considered a healthy product. Presence of additives and/or preserve agents is not permitted. On apiculture, sulfonamides are largely used on prevention and control of beehive disease, such as American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. A consequence of this practice is the presence of these residues in honey, that should cause allergy reactions on consumers. In the last years, some published works is discussing the presence of antibiotic and sulfonamides residues in honey. In Brazil, the presence of antibiotics residues in food is controlled by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and by the Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). The realization of monitoring contaminants residues in food programs, as well as the Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) from MAPA are essentials to the sanitary vigilance actions development, preventing and controlling possible hazard to the consumer health. This work has the objective the development and validation of multiresidue analytical method to the sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidine and sulfadimethoxine determination in bee honey using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). The established methodology consisted on such conditions: solid phase extraction with Nexus sorbent, elution with acetonitrile 5 mL, and reconstitution with sodium acetate buffer (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5, with 1% methanol addition, separation on analytical column C18, acetonitrile and water mobile phase, on gradient elution mode and detection on 278 nm. The sample preparation consisted on the acid hydrolysis with hydrochloric acid 2 mol L⁻¹ of a honey rate and adjust to pH 4,5 with sodium acetate buffer solution 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5. The method was validated and the results demonstrated accuracy and precision between the limits established by the current legislation. Good linearity range was encountered, obtaining recovery values varying from 41 to 89% and relative standard deviation estimative varying between 2,36 and 14% to the four studied compounds. The four sulfonamides detection limits in honey sample varying from 20 to 30 µg kg⁻¹ and the quantification limits varied from 60 to 90 µg kg⁻¹. Considering 100 µg kg⁻¹ the residue maximum limit established by the Brazilian legislation to the SDZ, STZ, SMZ and SDM total concentration, the described method permit suitable determination of the four sulfonamides in bee honey.

Keywords: Sulfonamides. HPLC-DAD. Solid phase extraction. Validation. Honey.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 2	Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.....	45
Quadro 3	Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.....	49
Quadro 4	Testes para seleção da composição da fase móvel.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição típica do mel.....	24
Tabela 2-	Propriedades gerais das sulfonamidas.....	27
Tabela 3-	Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.....	38
Tabela 4-	Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.....	64
Tabela 5-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	67
Tabela 6-	Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.....	74
Tabela 7-	Estudo da composição da fase móvel.....	80
Tabela 8-	Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.....	83
Tabela 9-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	87
Tabela 10-	Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)....	90
Tabela 11-	Resultados dos testes de eficiência de extração.....	91
Tabela 12-	Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.....	93
Tabela 13-	Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 14-	Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão.....	97
Tabela 15-	Parâmetros de validação para o método desenvolvido.....	98
Tabela 16-	Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.....	100
Tabela 17-	Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.....	102
Tabela 18-	Análise de amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de mel no Brasil.....	23
Figura 2	Diferentes tipos de mel.....	24
Figura 3	Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas: (a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.....	26
Figura 4	Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida)...	27
Figura 5	Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.....	28
Figura 6	(a) Esquema de cartucho para EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.....	44
Figura 7	Principais etapas empregadas EFS.....	45
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.....	50
Figura 9	Processo de fortificação das amostras.....	54
Figura 10	Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.....	59
Figura 11	(a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.....	60
Figura 12	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.....	63
Figura 13	Procedimentos experimentais empregados nas etapas de extração EFS.....	69
Figura 14	Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.....	72
Figura 15	Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.....	75
Figura 16	Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatógrafo: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm.....	76
Figura 17	Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, 1,0 mg L ⁻¹ , usando C ₁₈ (cromatograma vermelho), C ₈ (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).....	77
Figura 18	Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto).....	78
Figura 19	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água.....	81

Figura 20	Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,5.....	82
Figura 21	Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L ⁻¹	84
Figura 22	Estudo da degradação das soluções-padrão.....	84
Figura 23	Esquema da reação açúcar-sulfonamida.....	86
Figura 24	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , sem hidrólise ácida.	88
Figura 25	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , com hidrólise ácida.	89
Figura 26	Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de <i>clean-up</i>	92
Figura 27	Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹	93
Figura 28	Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.....	95
Figura 29	Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).....	96
Figura 30	Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de 100 ng g ⁻¹	100
Figura 31	Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá	102
Figura 32	Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.....	103
Figura 33	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins.....	103
Figura 34	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí.....	103
Figura 35	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L ⁻¹) pH 4,5/Metanol.....	129
Figura 36	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
C8	Fase estacionária do tipo octilsilano
CODEX	<i>Codex Alimentarius</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido com detector por arranjo de fotodiodos
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
CL	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida - EFS)
t _R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Detector por absorbância no ultravioleta-visível

LISTA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
STZ	Sulfatiazol
SAD	Sulfanilamide
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SID	Sulfisomidina
SMTX	Sulfametoxazol
SDM	Sulfadimetoxina
SBM	Sulfabenzamida
SDX	Sulfadoxina
SQX	Sulfaquinoxalina
SME	Sulfameter
SMX	Sulfamoxol
SMP	Sulfametoxipiridazina
SCP	Sulfacloropiridazina
SSZ	Sulfasalazina
SMDZ	Sulfametoxidiazina
SMTT	Sulfametiltiazol
SMM	Sulfamonometoxina
SAI	Sulfisoxazol
SCT	Sulfacetamida
SGN	Sulfaguanidina
SMT	Sulfametizol
STR	Estreptomicina
DHS	Diidroestreptomicina
CAP	Cloranfenicol
OTC	Oxitetraciclina
AMP	Ampicilina
TC	Tetraciclina
DMC	Democlociclina
CTC	Clorotetraciclina
NEO	Neomicina
PENG	Penicilina G
SPI	Espiramicina
DC	Doxiciclina
PEN	Penetamato
DES	Desmicosina
OLE	Oleandomicina
TIL	Tilmicosina
TYL	Tilosina
OXA	Oxacilina
EA	Eritromicina
CLOX	Cloxacilina
NAF	Naficilina
DIC	Dicloxacilina
ROXI	Roxitromicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µ	Micron
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	Minuto
sec	Segundo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
R ²	Coeficiente de Determinação ou de Correlação Múltipla ou Eficiência da Regressão
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Amostral
t	t de <i>Student</i>
$\bar{X}$	Média aritmética
x _i	Valor Medido
Σ	Somatório
√	Raiz quadrada
σ	Desvio padrão da população

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	22
1.1.1	Características físico-químicas do mel.....	23
1.1.2	Doenças nas abelhas e na colméia.....	25
1.2	SULFONAMIDAS.....	26
1.2.1	Resíduos de sulfonamidas no mel.....	29
1.2.2	Aspectos da legislação.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS.....	35
3.1	PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	43
3.1.1	Extração por Fase Sólida (EFS).....	43
4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.1	FAIXA DE APLICAÇÃO.....	49
4.2	LINEARIDADE.....	51
4.3	SELETIVIDADE.....	51
4.4	PRECISÃO.....	52
4.4.1	Repetitividade.....	52
4.4.2	Precisão intermediária.....	53
4.4.3	Reprodutibilidade.....	53
4.5	EXATIDÃO.....	53
4.5.1	Recuperação.....	54
4.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	55
4.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	56
5.	MATERIAIS E MÉTODO.....	58
5.1	METODOLOGIA.....	58
5.1.1	Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas.....	58
5.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	60

5.2.1	Padrões.....	60
5.2.2	Reagentes e Solventes.....	60
5.2.3	Dispositivos para Extração por Fase Sólida.....	60
5.2.4	Coluna Cromatográfica.....	61
5.2.5	Equipamentos.....	61
5.2.6	Outros materiais.....	62
5.3	MÉTODO.....	62
5.3.1	Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas.....	63
5.3.1.1	Seleção da coluna.....	64
5.3.1.2	Linha de Base do Solvente.....	64
5.3.1.3	Conformidade do Sistema.....	64
5.3.1.4	Seleção do Comprimento de onda.....	65
5.3.1.5	Seleção da fase móvel.....	65
5.3.1.6	Preparação dos padrões.....	65
5.3.2	Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração.....	66
5.3.2.1	Pré-tratamento da amostra.....	66
5.3.2.2	Seleção do adsorvente.....	67
5.3.2.3	Condicionamento dos cartuchos.....	67
5.3.2.4	Eluição dos analitos.....	68
5.3.2.5	Extração por EFS.....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	69
5.4.1	Seletividade.....	70
5.4.2	Linearidade.....	70
5.4.3	Limites de Detecção e de Quantificação.....	70
5.4.4	Estudo de recuperação.....	71
5.4.4.1	Precisão.....	71
5.4.4.2	Exatidão.....	71
5.5	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1	SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	74
6.2	SELEÇÃO DA COLUNA.....	77
6.3	SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	77
6.3.1	Seleção do pH da fase móvel.....	78

6.3.2	Composição da fase móvel.....	79
6.3.3	Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho.....	82
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	83
6.5	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS.....	85
6.5.1	Pré-tratamento da amostra.....	85
6.5.2	Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração em fase sólida.....	90
6.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	94
6.6.1	Conformidade do sistema.....	94
6.6.2	Seletividade.....	95
6.6.3	Curva analítica.....	96
6.6.4	Faixa linear, linearidade, sensibilidade.....	97
6.6.5	Limites de detecção e quantificação.....	97
6.6.6	Precisão e Exatidão.....	98
6.6.6.1	Precisão.....	98
6.6.6.2	Exatidão.....	99
6.6.6.3	Avaliação estatística do método.....	101
6.7	ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	101
7.	CONCLUSÃO.....	106
8.	REFERÊNCIAS.....	108
9.	ANEXOS.....	127
9.1	ANEXO 1.....	127
9.2	ANEXO 2.....	128
9.3	ANEXO 3.....	129

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável. A adição de aditivos e agentes conservadores no mel não é permitida. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas em mel. Antibióticos são principalmente usados na apicultura para o tratamento de doenças bacterianas ou outros tipos de doenças infecciosas [1].

Para aceitação do produto apícola, no Brasil, é necessário que o produto obedeça ao regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A legislação vigente é descrita na Instrução Normativa N. 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [2]. A citada norma define tipos de mel, procedimento de obtenção, apresentação e/ou processamento, além de estabelecer limites para os dez principais parâmetros físico-químicos, importantes na avaliação da pureza, maturidade e possível adulteração do mel.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro no mercado externo, é necessário que o produto cumpra as exigências estabelecidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), mais especificamente do Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM [3]. O programa visa atender às exigências do mercado externo, em especial da Comunidade Européia, responsável por mais de 90% da exportação de mel brasileiro e estabelece, dentre outras coisas, a avaliação quanto à presença de resíduos no produto, o potencial da utilização inadequada de drogas no produto e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas. Várias classes de substâncias tóxicas são incluídas neste programa, mais especificamente organoclorados, antibióticos, metais pesados, substâncias promotoras de crescimento, tireostáticos e sulfonamidas.

A ausência de controle de resíduos no mel brasileiro foi a principal justificativa para o embargo ocorrido em 2006 na União Européia [4]. Uma das grandes preocupações do mercado apícola atual é a eliminação total de resíduos de antibióticos e defensivos agrícolas no mel. Utilizados para prevenir e tratar enfermidades nas abelhas e doenças de origem bacteriana na colméia fora da época de florada, os antibióticos, se utilizados sem o devido controle, podem causar prejuízos a qualidade do mel. A restrição do comércio internacional baseia-se no fato de que tais substâncias poderiam atingir o consumidor, que estaria ingerindo o mel contaminado, acarretando danos à sua saúde, tais como, adaptação e resistência de

bactérias no organismo. Por este motivo é que, recentemente, alguns países compradores de mel têm incluído em suas exigências um produto apícola livre de antibióticos.

Embora o uso de antibióticos em colméias seja uma prática constante dos apicultores, o Brasil possui um grande diferencial no contexto mundial, visto que existem poucos registros de doenças comuns em abelhas, principalmente na região Nordeste.

Sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, na apicultura, são utilizadas no tratamento e prevenção da “cria pútrida” em abelhas, doença provocada pelo *Paenobacillus larvae*. Uma consequência direta do uso é a ocorrência de resíduos de sulfonamidas no mel de abelhas, o que compromete a qualidade do produto [5].

Estudos para estes compostos incluem procedimentos colorimétricos como a reação de Bratton-Marshall [6;7]; cromatografia em camada delgada (CCD) [8], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) [9, 10; 11; 12; 13; 14; 15 e 16, dentre outros], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) [17; 18; 19; 20 e 21, dentre outros] espectrometria de massas no modo “tandem” (CLAE-EM ou CLAE-EM/EM) [22; 23; 24; 25; 26; 27 e 28, dentre outros].

A literatura atualmente disponível para análise de sulfonamidas em mel ressalta a especificidade da matriz com relação à aplicação de métodos analíticos. No Brasil, existem poucos trabalhos com sulfonamidas em mel. A disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos apícolas, quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, é essencial para fornecer aos apicultores garantias sobre a qualidade de seu produto, garantindo-lhes condições de exportar. Pelo exposto é que veio o interesse em fazer esta pesquisa. Este trabalho também poderá ser utilizado como um incentivo na realização de novos estudos envolvendo sulfonamidas em alimentos (matrizes diferentes de mel).

1.1 MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS

O Brasil tem um grande potencial apícola, devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variedade edafoclimática existente, o que possibilita produzir mel o ano todo [29]. A apicultura é uma atividade que se enquadra no tripé da sustentabilidade podendo favorecer programas de desenvolvimento econômico, social e ecológico como os existentes no Nordeste brasileiro. Em 2004 o Brasil alcançou a posição

de 11º produtor mundial de mel (40 mil toneladas) e o 5º exportador mundial (21 mil toneladas). No cenário mundial, os principais produtores de mel são China, Estados Unidos e Argentina e os maiores exportadores são China, Argentina, México e Alemanha. No Mercosul, o Brasil é superado apenas pela Argentina. A produtividade brasileira ainda é baixa [3].

Dos produtos apícolas o mel é o que tem maior destaque para o comércio. A região Sul é a principal região produtora de mel no país com 47,72%. A região Nordeste vem na segunda posição com 31,58% da produção, seguida das regiões Sudeste (16,22%), Centro-Oeste (2,87%) e Norte (1,62%) [3].

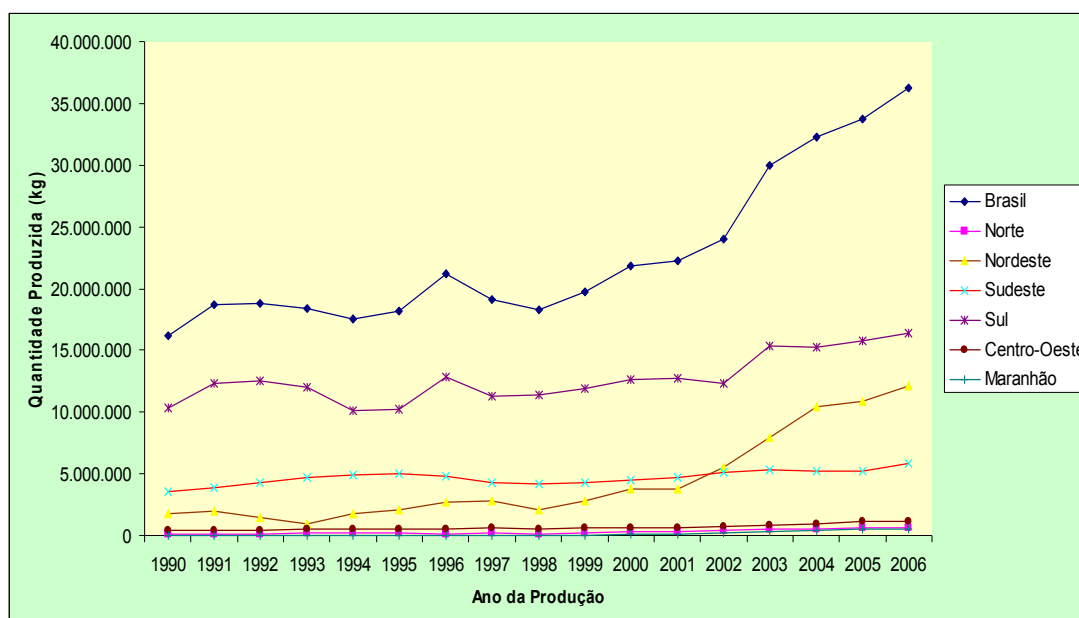


Figura 1 – Produção de mel no Brasil.

Fonte: adaptado de [30]

Segundo dados do IBGE [31] o Maranhão, no ano de 2005, passou a ocupar a 10ª posição no *ranking* nacional, tendo alcançado um aumento de produção de 289 % em relação à estatísticas realizadas pelo mesmo órgão no ano de 2001, comprovando-se o grande potencial de produção do estado.

1.1.1 Características físico-químicas do mel

O mel (Figura 2) é um produto biológico muito complexo, devido a sua composição variar com a flora e ser influenciado pelas condições climáticas e edafológicas da

região onde foi produzido [32]. Segundo Crane [33] mel é o resultado da desidratação e transformação do néctar, portanto a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar.



Figura 2- Diferentes tipos de mel.
Fonte: Internet: [34]

A composição físico-química do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais também estão diretamente relacionados com a fonte do néctar que o originou e assim como com a espécie da abelha que o produziu [32]. A Tabela 1 apresenta uma visão geral da composição química do mel.

Tabela 1 - Composição típica do mel.

Componente	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76-1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 -40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020-1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	----
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68-59,49	10,33
Proteína (%)	0,1686	0,0577-0,567	7,09

Fonte: NATIONAL HONEY BOARD [35].

Sabor e aroma. O sabor e aroma característicos do mel são conferidos pela presença dos compostos voláteis. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado

diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-los dos favos [36]. Os aromas podem ser classificados em característico, adocicado, floral, cera e queimado. Já o sabor pode ser classificado como característico, adocicado, floral, cera, queimado, ácido e residual.

Cor. “A coloração do mel” é normalmente interpretada como algo mais escuro que creme e mais claro que marrom. A cor do mel líquido pode realmente variar de branco-aquoso a próximo de preto, com variantes tendendo para matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul [33].

Água. O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% [37]. Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. A quantidade de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade [32].

Açúcares. O poder adoçante do mel é avaliado em cerca da metade do atribuído ao mesmo peso de açúcar de cana [33]. Além da doçura, os açúcares são responsáveis por outras características, tais como: capacidade de conservação, poder higroscópico e habilidade de promover cor e sabor [38]. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5% a 40% para a glicose e de 36,2% a 49,6% para a frutose, de acordo com a florada [39].

Diversos. Outros componentes importantes presentes no mel são as enzimas, os aminoácidos, os ácidos orgânicos e minerais.

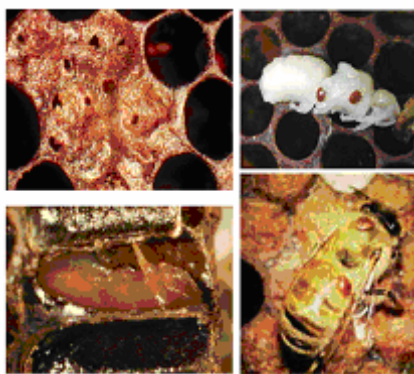
1.1.2 Doenças nas abelhas e na colméia

Assim como em seres humanos as abelhas são susceptíveis a numerosas enfermidades, necessitando de tratamentos adequados à base de fármacos como as sulfonamidas para prevenção e/ou tratamento destas. Na Figura 3 são apresentadas as doenças que mais afetam abelhas e colméias. Dentre as enfermidades que mais as afetam está a cria pútrida.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (*American Foulbrood*), é produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas [40; 41]. O tratamento ocorre pela administração dos antibióticos na água ou através de alimentação artificial contendo a medicação, geralmente administrada, antes da florada [42].

Este tipo de doença quando acontece é capaz de dizimar dezenas de colméias, sendo uma enfermidade muito temida pelos apicultores.

O Brasil tem se destacado no cenário internacional por ter praticamente erradicado esta doença. A grande questão que envolve doenças na apicultura, assim como em outras atividades produtoras de alimentos, é a utilização de fármacos na prevenção ou tratamento destas. As sulfonamidas são compostos que podem ter sua ação prolongada por muito tempo dependendo do tipo de matriz a qual ela está presente [43]. O uso inadequado de fármacos na prevenção ou controle de doenças na colméia pode acarretar danos a qualidade do produto e causar problemas na saúde do consumidor, uma vez que a contaminação do mel com resíduos de sulfonamidas numa colméia mantém-se durante anos.



(a)

(b)

Figura 3 – Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas:
(a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.
Fonte: Internet: [44]

1.2 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, tendo sido desenvolvidas em 1935, pelo cientista Gerhard Domagk [45]. São compostos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Figura 4). Sua classificação é realizada com base no grau de absorção pelo trato gastrointestinal e através da duração de seu efeito [46].

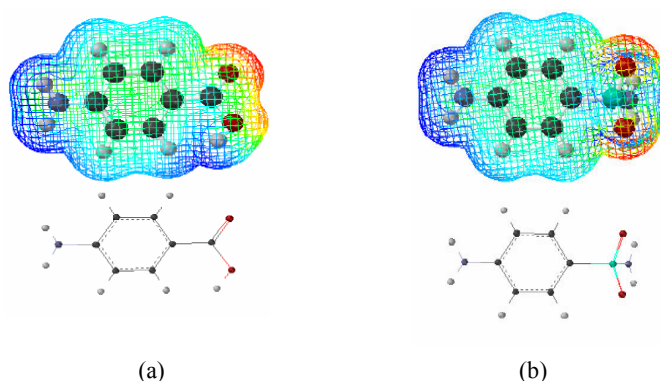


Figura 4 - Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida).
 Fonte: Internet: [47]

Possuem ação bacteriostática e atuam competindo com o ácido *p*-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico, agindo de forma sistêmica, com ação de curta ou longa duração, dependendo do tipo [48].

Os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana das sulfonamidas estão reunidos na própria molécula da sulfanilamida. O grupo – SO₂NH₂ não é essencial em si, mas tem a importante característica do enxofre estar diretamente ligado ao anel benzênico [48].

Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, *pKa*, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica [48].

Quimicamente, as sulfonamidas são ácidos fracos, relativamente insolúveis em água, que apresentam *pKa* variado e são iônicas por natureza [49]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas relevantes das sulfonamidas em estudo nesta pesquisa.

Tabela 2 – Propriedades gerais das sulfonamidas.

Composto	CAS- Number	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)*	Sol. em H ₂ O* (mg /100 mL)	Log K _{ow}	<i>pKa</i>
Sulfadiazina	[68-35-9]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.26	13	0,12 ^b	6,50
Sulfadimetoxina	[122-11-2]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1	1,4 ^a	6,21
Sulfadimidina	[57-68-1]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	272.33	192	0,25 ^a	7,45
Sulfatiazol	[72-14-0]	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.32	1	--	7,24

Fonte: *[50] ; ^a [27]; ^b [51]

A solubilidade das sulfonamidas varia muito em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional. Em meios alcalinos a solubilidade é maior que em pH neutro e ácidos, aumentando em meio ácido de sais sódicos [52].

Em sua molécula as sulfonamidas contêm um grupo amina básico (-NH_2) e um grupo amida ácido (-NH-) que correspondem ao $\text{p}K_{a1}$ e $\text{p}K_{a2}$, respectivamente; apresentando caráter anfótero, ou seja, em soluções básicas o comportamento das sulfonamidas é ácido, devido ao N1 (nitrogênio ácido, que apresenta capacidade de doar prótons), já em soluções ácidas o comportamento das sulfonamidas é básico, devido ao N4 (nitrogênio básico - que apresenta capacidade de captar prótons). A completa ionização é conseguida quando o pH do analito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de $\text{p}K_a$, para compostos ácidos e básicos, respectivamente [53].

Na Figura 5 é apresentado um esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio. Em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

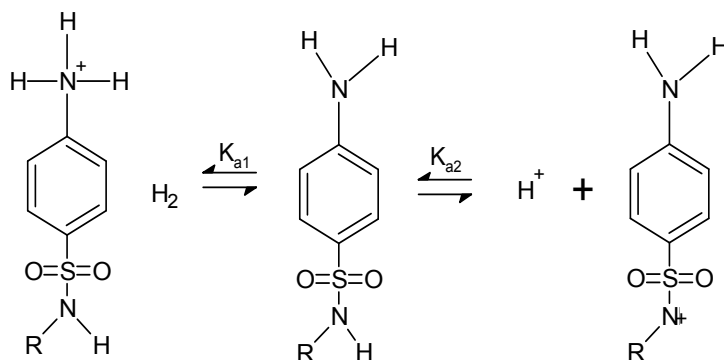
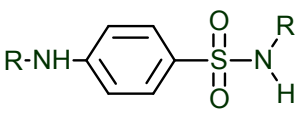
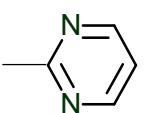
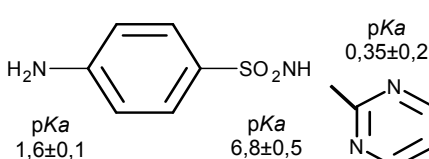
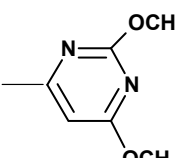
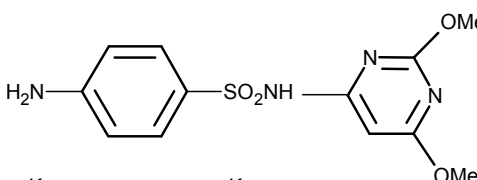
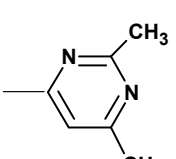
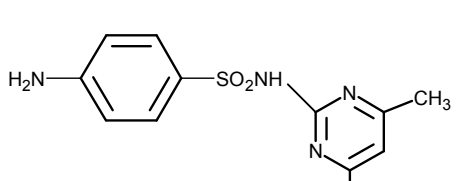
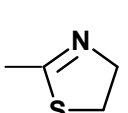
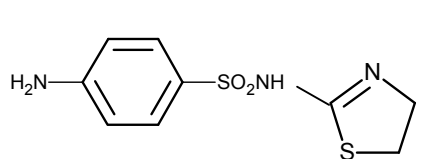


Figura 5 – Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.
Fonte: [53]

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares das sulfonamidas selecionadas para este estudo, bem como as variações dos valores de $\text{p}K_a$ dos respectivos grupos funcionais das sulfonamidas.

Fórmula Geral das Sulfonamidas		
		
Sulfonamida	Radical	Estrutura Completa
Sulfadiazina (SDZ)		 pK_a 1,6±0,1 pK_a 6,8±0,5 pK_a 0,35±0,2
Sulfadimetoxina (SDX)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfadimidina (SDD)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfatiazol (STZ)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5

Quadro 1 – Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo
 Fonte: adaptado de [51], [54] e [23].

1.2.1 Resíduos de sulfonamidas no mel

No que se refere à saúde pública, o monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos vem-se tornando um assunto cada vez mais discutido em nível mundial [51]. Uma grande variedade de fármacos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses,

os das classes: sulfonamidas, betalactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos [55].

Atualmente, grandes volumes de mel são solicitados por mercados internacionais, fazendo com que novas práticas apícolas sejam implantadas a fim de garantir que a produção esteja protegida de possíveis ataques de pragas, doenças ou contaminações [3].

A utilização de fármacos na prevenção e/ou tratamento de doenças na colméia é prática comum entre os apicultores. Resíduos de sulfonamidas podem ocorrer no mel como consequência da utilização destes fármacos no tratamento de doenças de origem bacteriana. A presença de resíduos de sulfonamidas no mel não é desejável, uma vez que o mel é um produto natural e saudável e que, como tal, não deve apresentar substâncias comprovadamente tóxicas.

As exposições de humanos a doses de resíduos de fármacos podem gerar possíveis efeitos prejudiciais à saúde do consumidor. Os efeitos mais comumente encontrados são reações alérgicas, desordens na flora intestinal e possível impacto da resistência de antimicrobianos utilizados em terapia humana. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se, ainda, que aproximadamente 5% dos pacientes humanos tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [56]. Deve-se salientar, entretanto, que ainda não existem evidências científicas demonstrando que esta associação seja decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [57].

1.2.2 Aspectos da legislação

Visando proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores em saúde pública estabeleceram níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) quanto à presença de fármacos em alimentos de origem animal [57]. O LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduo com o qual não ocorra perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) [52].

No Brasil, o Ministério da Saúde é quem estabelece os LMR e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os responsáveis pelas ações fiscais de vigilância do uso de fármacos em alimentos.

Na produção de produtos de origem animal o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do MAPA. O PNCR tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do mel e de outros produtos de origem animal, no território nacional, bem como o aporte dos produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas aos conhecimentos das violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais. Para isto, são colhidas amostras dos alimentos, junto aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) [57].

O LMR de sulfonamidas em mel fixado pelo PNCR é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina (Quadro 01, ANEXO 1).

A ANVISA, recentemente, vem implantando um Programa de Análise de Resíduos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) para diversos tipos de alimentos (leite, carnes, ovos e mel de abelhas), cujo objetivo é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária [58].

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

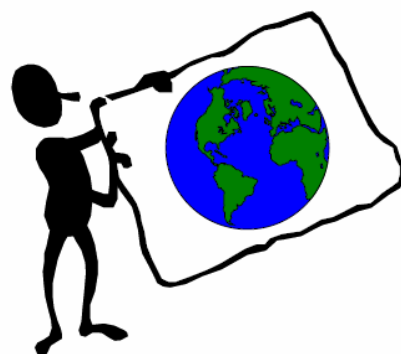
2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para determinar sulfonamidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Comparar diferentes tipos de processos de extração/pré-concentração de sulfonamidas, utilizando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de méis;
- Divulgar a problemática envolvendo a presença de fármacos em alimentos.

3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS



3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que procedimentos de controle de qualidade de alimentos sejam realizados a fim de verificar a presença de resíduos de sulfonamidas e outros contaminantes. O desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença destes resíduos em diferentes matrizes alimentícias tornam-se fundamentais [52]. Segundo Davidson e Branem [59], o monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de medicamentos veterinários tem aumentado devido à importância da repercussão em saúde pública.

A determinação de resíduos de sulfonamidas envolve quantificação de concentrações muito baixas, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. As técnicas analíticas mais comumente usadas para a quantificação destes resíduos são as cromatográficas, associadas a diferentes sistemas de detecção, tais como UV, arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas [52].

A cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos tem sido utilizada com êxito para determinar vários resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal [18]. Embora atualmente muitos métodos confirmatórios como, o CLAE-EM/EM, para a determinação de sulfonamidas em alimentos sejam citados na literatura, estes tipos de determinação requerem o uso de equipamentos caros sendo, portanto, de menor disponibilidade na maioria dos laboratórios de química, principalmente em universidades [60].

A análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento, extração e/ou *clean up* da amostra [49] devido à necessidade de separar, de uma matriz orgânica complexa, compostos em concentrações bastante baixas, de forma a minimizar a presença de interferentes na matriz.

Vários métodos de determinação das sulfonamidas em alimentos estão disponíveis na literatura internacional. Dentre os trabalhos sobre resíduos de sulfonamidas em mel por HPLC pode-se destacar: ZOTOU e VASILIADOU [11]; MAUDENS, ZHANG e LAMBERT [61]; MARTEL e ZEGGANE [62]; PANG *et al.* [63]; HORIE *et al.* [64]; dentre outros.

Zotou e Vasiliadou [11] desenvolveram um método seletivo para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel por SPE-RP-HPLC com detecção UV. A separação das sulfonamidas foi realizada usando coluna C18 (ODS-3), no modo isocrático, e como fase móvel utilizou-se metanol e solução-tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com 1% de ácido acético

(v/v). A detecção UV foi em 263 nm. As amostras de mel foram diluídas em solução-tampão acetato (0,05M) pH 3,6. Utilizou-se cafeína como padrão interno. A extração do resíduo foi realizada usando extração em fase sólida com cartuchos de fase polimérica (Nexus). Recuperações médias dos analitos variaram de 80 a 117%, com limites de detecção de 20 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Maudens, Zhang e Lambert [61] desenvolveram e validaram um método para determinação de doze sulfonamidas (sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina e sulfadoxina) em mel. O pré-tratamento da amostra incluiu uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L⁻¹, seguida por extração líquido-líquido e extração em fase sólida (utilizando cartucho de troca catiônica). A separação foi realizada utilizando-se coluna RP18, no modo gradiente, e com fase móvel constituída de acetonitrila e solução-tampão acetato (0,020 mol L⁻¹) pH 4,75. A detecção foi realizada em comprimento de excitação de 420 nm e comprimento de emissão de 485 nm. O método demonstrou boa exatidão e precisão. O pré-tratamento da amostra aumentou a eficiência do *clean up*. Foram encontradas recuperações médias, nos três níveis, variando de 38,2 a 66,8% e limites de detecção e quantificação de 1 ou 2 e 2 ou 5 ng g⁻¹, respectivamente.

Martel e Zeggane [62] descreveram um método para determinação de sulfatiazol em mel. Foi realizada uma etapa de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. Uma alíquota da amostra hidrolisada utilizando ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ e submetido a uma pré-coluna de derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com detector por fluorescência, usando coluna C18 (Hypersil BDS), no modo isocrático, e com fase móvel composta de acetonitrila e solução de ácido acético 2%. Para a detecção por fluorescência foi aplicado um comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. O limite de quantificação foi de 10 ng g⁻¹. As recuperações variaram de 60,6 a 71,8%. A estimativa do desvio padrão relativo variou na faixa de 0,5 a 2,9%.

Pang *et al.* [63] desenvolveram um método para a determinação de oito sulfonamidas (sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido fosfórico (pH 2). As amostras foram filtradas e em seguida procedeu-se à extração em fase sólida utilizando-se dois cartuchos um de troca catiônica e outro OASIS HLB. Procedeu-se à derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada por cromatografia líquida por detecção por fluorescência, usando coluna RP 18, no modo

isocrático, e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e solução de dihidrogeno-fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹. A detecção foi realizada com comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. Recuperações médias nos três níveis de fortificação variaram de 73,5 a 94,1% e coeficientes de variação de 4,35 a 16,60%. O limite de detecção foi de 0,002 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina, e 0,005 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina. O limite de quantificação foi de 0,005 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina e 0,010 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

Horie, Satto e Nose [64] desenvolveram um método usando cromatografia líquida por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) para a determinação simultânea de dez sulfonamidas (sulfatiazol, sulfacloropiridazina e sulfaquinoxalina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 30% e, então, extraídas com diclorometano. Os extratos foram percolados em cartucho de Florisil para realizar um *clean up* na amostra. A separação cromatográfica foi realizada em coluna RP-18 (Lichosphere), como fase móvel utilizou-se solução de dihidrogeno fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹) e acetonitrila. A detecção foi a 275 nm. As recuperações no nível de 0,05 µg g⁻¹ foram de 62,1 a 90,2% e os limites de detecção foram 0,05 µg g⁻¹ para cada composto.

Na Tabela 3 são apresentados métodos cromatográficos assim como os métodos de extração reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em mel e em outras matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
HAMMEL <i>et al.</i> [22]	Mel	SDZ,SMR,STZ,SPD, SAD,SMZ,TAP,SME, DAP,SID,SMTX,SDM, STR,DHS,CAP,SBM, OTC,AMP,TC,SDX, SQX,DMC,CTC,NEO, PENG,SPI,DC,PEN, DES,OLE,TIL,TYL, OXA,EA,CLOX,NAF, DIC,ROXI,AMOX,SCP	HPLC-ESI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 26-61% e Limites de detecção de 31,3-49,0 µg/kg
WANG <i>et al.</i> [65]	Mel e frango	SMT, SMR e SDZ	HPLC-DAD Imunoensaio com polarização fluorescente	Foram encontradas recuperações de 86-131%. Limites de detecção de 0.9 ng g ⁻¹ 3.1 ng g ⁻¹ .
TAMOSUNAS e PADARAUSKAS [66]	Mel e ovos	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPLC-MS/MS UPLC-MS/MS LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 80-110%. Limites de decisão de 6.61-9.43 µg kg ⁻¹ and 7.25-11.9 µg kg ⁻¹ para UPLC e LC, respectivamente.
GRANJA <i>et al.</i> , [67]	Mel	STZ, SMZ E SDM	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 61.0% a 94.5%. Limites de detecção de 3 µg kg ⁻¹ , 4 µg kg ⁻¹ and 5 µg kg ⁻¹ respectivamente
ZOU <i>et al.</i> , [68]	Mel	STZ, SPD, SDZ, SMR, SMMX, SCP, SMX, SDM	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações > 70%. Limites de detecção 4 µg kg ⁻¹ .
MOHAMED <i>et al.</i> [24]	Mel	SAD,DAP,SPD,SDZ, SMTX,STZ,SMR,SMX, SMP,SME,SCP,SQX, SDX,SDT,SSZ	HPLC-APPI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,4% e Limites de quantificação de 10 µg/Kg
KOESUKWIWAT <i>et al.</i> [23]	Leite	SDZ,STZ,SMZ,SMP, SMX,SDM,CTC,TC OTC,PYR	HPLC-ESI-MS SPE	Foram encontradas recuperações de 5-166% (nos vários níveis)
SUN <i>et al.</i> [9]	Envoltório para salsicha (tripa de origem animal)	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMDZ,SMT,SMMX, SMP,SIA,SMX,SDM, SQX	HPHPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 65,2-85,9%. Limites de detecção de 0,3-0,4µg/kg e limites de quantificação de 1,5-2,2 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
LU <i>et al.</i> [25]	Carne (suína)	SDZ,STZ,SMR,SMT, SMMX,SMXZ,SQX, SDMX	HPLC-ESI-MS HPLC-APCI-MS SPME	Limites de detecção de 16-39 µg/Kg e limite de quantificação de 53-130 µg/Kg
KISHIDA [26]	Carne (bovina, aves, suína)	SDD,SDZ,SMM,SMX, SDM,SQX	HPLC-MS MSPD	Foram encontradas recuperações de 90,5-97,6% e Limites de quantificação de 0,006-0,04 µg/g
GARCÍA <i>et al.</i> [17]	Visceras de animais (rim)	SDZ,SMT,SMP,SMX SDM,SQX	HPLC-DAD LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 46-63%. Limites de decisão de 3,48-3,84 µg/Kg e Capacidade de detecção de 109,8-161,7 µg/Kg
BISWAS <i>et al.</i> [69]	Carne (búfalo)	TMP,SDD,SDX,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 75-108%. Limite de detecção de 0,031µg/g e limite de quantificação de 0,062 µg/g
FELTRIN <i>et al.</i> [10]	Leite	SDX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 76-90% e limite de detecção de 4,59µg/L e limite de quantificação de 13,9 µg/L
ZOTOU e VASILADOU. [11]	Mel	SCT,STZ,SPD,SMR SMP,SMX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 80-117% e Limites de detecção de 20-25µg/Kg
WANG <i>et al.</i> [49]	Produtos de origem animal	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPHPLC,HPCE, THPLC,ELISA, IMUNOENSAIOS LLE,SPME,SPE	Vários artigos sobre sulfonamidas em alimentos de origem animal
GALLINA <i>et al.</i> [12]	Mel	Streptomycina, Tylosin, SAD,SDZ,STZ,SMZ, SDX,SMTX,SDM	HPLC-FL LLE	Foram encontradas recuperações de 11,5-96,5%. Limites de detecção de 1,7-22ng/mL e limites de quantificação de 5,5-75 ng/mL
PECORELLI <i>et al.</i> [70]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SMMX,SCP,SMX SQX,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 62,4-85,1% e Limite de decisão 105,3-109,5 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
KISHIDA e FURUSAWA [19]	Carne (aves) e ovos	SMM,SDM,HIDRÓXI/N ⁴ -ACETIL	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 90-97% e limites de detecção de 7,2-29,8 ng/mL
LAMBA <i>et al.</i> [71]	Leite	SAD,SGN,SDZ,STZ, SMTX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 85-114%. Limites de detecção de 1,59-7,68 nmol/L e limites de quantificação de 5,3-25,59 nmol/L
PANG <i>et al.</i> , [72]	Mel	STZ, SCT, SAI, SMM, SDX,SDZ, SPD, SCP, SMTX, SMR, SMP, SDM, SMZ, SME	HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70.9-102.5%. Limites de quantificação de 1.0 and 12.0 µg/kg
POSYNIK <i>et al.</i> [73]	Carne (frango)	SDZ,SMZ,SMX,SMR, SDM,SMP	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações de 90-95%. Limites de detecção 1 ou 5 µg/Kg CCα: 103,8-127,6 µg/Kg CCβ: 115,0-137,4 µg/Kg
MAUDENS <i>et al.</i> [61]	Mel	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SME, SMT,SMP,SCP,SDX	HPLC-FL LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 37,4-66,8%. Limites de detecção de 1-2 ng/g e limites de quantificação de 2-5ng/g
PECORELLI <i>et al.</i> [18]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SQX,SDM,SCP, SMM,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 51-109% CCα: 105,2-116,2 µg/Kg CCβ: 110,9-134,9 µg/Kg
GENTILI <i>et al.</i> [60]	Carne e alimentos infantis	SID,SDZ,SPD,SMR, SMO,SMZ,SMT,SMP, SMM,SCP,SMX,SQX, SDM	HPLC-MS/MS	Foram encontradas recuperações de 70-101%. Limite de detecção de 2,6 ppb e limites de quantificação de 1,2-7,8 ppb
ZAYAS-BLANCO <i>et al.</i> [13]	Leite	SMZ	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 82,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 3µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
POSYNIAK <i>et al.</i> [74]	Mel	SCT,STZ,SMZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80%. Limites de detecção de 0,1µg/Kg e limites de quantificação de 0,2 µg/Kg
PANG <i>et al.</i> [63]	Mel	SCT,SPD,SMR,SMP, SME,SCP,SMX,SDM	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 73,5-94,1%. Limites de detecção de 0,005mg/Kg e limites de quantificação de 0,002 mg/Kg
REYBROECK [75]	Mel	Streptomycin, Tetracyclines, Cloranfenicols, SMZ, STZ,SCT	HPLC-UV	Limites de detecção para as sulfas de 25-50µg/Kg e limite de quantificação para as sulfas de 20µg/Kg
MARTEL e ZEGGANE [62]	Mel	STZ, SMZ	HPLC-FL IMUNOENSAIO DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 2µg/Kg
FURUSAWA [21]	Leite	OTC,SDD	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 88,8-93,1%. Limites de quantificação 0,044 µg/mL (OTC) e 0,023 µg/mL(SDD)
POSYNIAK <i>et al.</i> [76]	Mel	SCT,SMT,STZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80,9-83,4%. Limite de detecção de 0,1-0,5µg/Kg
HELLER <i>et al.</i> [77]	Ovos	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SMZ, SMT,S P,SCP,SMX, SMMX,SIA,SDM,SQX	HPLC-MS-MS HPLC-UV LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 51-103%
FURUSAWA [14]	Leite	SMZ,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 81-94%. Limites de detecção de 5-10ng/mL e limites de quantificação de 3-5ng/mL

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
STOEV e MICHAILOVA [78]	Produtos de origem animal	SAD,SDZ,SMR,SDD, SMP,SOX,SMX,SDM, SQX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 64-75% e Limites de detecção de 0,5-1,0 µg/g
ITO <i>et al.</i> [79]	Visceras de animais (rins e fígado)	SDZ,SMR,SDD,SMP, SAI,SMMX,SMTX, SDM,SQX	HPLC-UV HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70,8-98,2% e Limites de detecção de 0,03 µg/g
FURUSAWA [80]	Leite	SMZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações maiores que 83% e Limites de detecção de 4 µg/kg
HEERING <i>et al.</i> [81]	Mel	TC, Streptomycin, STZ	Imunoensaio - EIA	Foram encontradas recuperações de 100-105%. Limites de detecção de 50 µg/g
GEHRING <i>et al.</i> [82]	Salmão	SDZ	HPLC-API/MS	Foram encontradas recuperações de 59,2-78,3%. Limite de detecção de 0,2 ng/g e limite de quantificação de 1,0 ng/g
CANNAVAN <i>et al.</i> [83]	Carne	SMT	CG-MS SPE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 86-114% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
VIÑAS <i>et al.</i> [84]	Leite	SA,SGN,SDZ,SPD,SMX	HPLC-FL LLE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 82-104% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
HORIE <i>et al.</i> [64]	Mel	STZ,SDZ,SMR,SMP, SDD,SMMX,SCP, SMX,SQX,SDM	HPLC-DAD SEM EXTRAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 62,1-90,2%. Limites de detecção de 0,8µg/g
AGARWAL [15]	Leite	SDZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 83-88%
PATHY [85]	Carne	SQX	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 77-85%

3.1 PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise de quantidades muito pequenas (traços) de contaminantes em matrizes complexas como alimentos frequentemente requerem inúmeras etapas de preparação e extração de amostras antes das técnicas de análises instrumentais (detecção e quantificação). Dentre as várias etapas envolvidas na preparação de amostras, alguns passos são mais comuns, tais como amostragem (homogeneização), extração, *clean-up* (eliminação de interferentes), separação e concentração, detecção e quantificação dos analitos [86].

Técnicas, como a cromatografia a líquido, requerem uma etapa de preparo da amostra antes da análise, de forma a minimizar erros na análise e evitar danos nas colunas cromatográficas [87].

Atualmente existem vários métodos para o preparo de amostras, com inúmeras possibilidades, vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método quando se trabalha com matrizes complexas, como alimentos, exigem que o analista tenha o conhecimento tanto da matriz com a qual se está trabalhando assim como da técnica instrumental que será utilizada posteriormente para a detecção/quantificação do composto, a fim de evitar, principalmente, que interferentes possam ser co-eluídos juntamente com os analitos de interesse e efeitos de matriz sejam incluídos nos resultados [88].

Segundo Queiroz, Collins e Jardim [89], as técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo do analista gasto durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras em determinado tempo.

Dentre as técnicas de extração mais comumente utilizadas para concentrar analitos em mel pode-se destacar a extração em fase sólida (EFS) [11; 63; 72; 73 e 74], extração líquido-líquido (LLE) seguida de EFS [61], e extração líquido-líquido [12 e 22].

3.1.1 Extração por Fase Sólida (EFS)

A extração por fase sólida é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [88]. O método de extração por fase sólida foi desenvolvido na década de 70, visando resolver algumas desvantagens da extração líquido-líquido e otimizar rotinas [90].

É uma técnica que consiste na separação líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica, através da qual a solubilidade de interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição [88; 91]. Através de forças intermoleculares, do tipo das de Van der Waals ou dipolo-dipolo, entre o analito e a superfície adsorvente da fase sólida ocorre o mecanismo de retenção e eluição dos analitos. Dependendo do grau de afinidade do analito com o solvente de eluição, este terá maior ou menor retenção [88].

A extração por fase sólida tem vários objetivos [87], sendo eles:

- (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;
- (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes;
- (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito; e
- (d) estocagem da amostra, muito usada para evitar o transporte de grandes volumes das mesmas.

Existem dois tipos de sistemas de extração por fase sólida: em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema em linha, a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. No sistema fora de linha (*off-line*), a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor [91]. Nesta pesquisa, utilizou-se o método de extração em fase sólido com sistema off-line.

Na prática, para uma extração por fase sólida são utilizados tubos de polipropileno no formato de seringa, contendo a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia), usualmente denominada cartucho de extração [88], conforme mostrado na Figura 6.

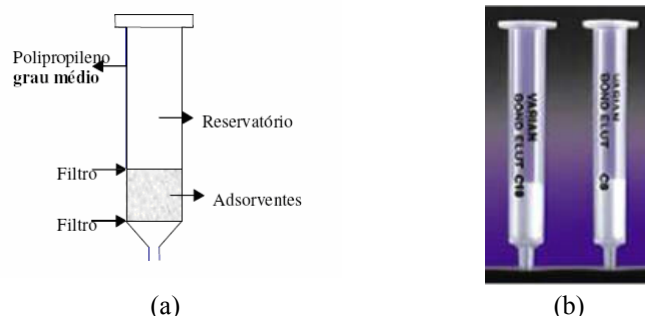


Figura 6 – (a) Esquema de cartucho para extração EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.

Fonte: (a) [88]

O atual estágio de desenvolvimento da extração em fase sólida deve-se em grande parte às descobertas de novos adsorventes [89]. No Quadro 2 são apresentados os principais tipos de adsorventes utilizados em extração em fase sólida.

Quadro 2 - Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.

Não-polares	Polares	Troca Iônica
Octadecilsilano – C18	Florisil – FL	Benzenossulfonilpropilsilano – SCX
Octilsilano – C8	Alumina – Al	Sulfonilpropilsilano – PRS
Etilsilano – C2	Sílica – Si	Carboximetilsilano – CBA
Metilsilano – C1	Cianopropilsilano – CN	Dietilaminopropilsilano – DEA
Fenilsilano – PH	Diolsilano – 2OH	Trimetilaminopropilsilano – SAX
Cicloexilsilano – CH	Aminopropilsilano – NH ₂	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA
	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA	
	Poliméricas (Nexus)	

Fonte: adaptada de [91]

Recentemente, alguns estudos visando desenvolver fases de EFS com aplicações mais específicas têm sido desenvolvidos. As fases poliméricas são exemplos típicos destas fases, as quais possuem maior capacidade de retenção que as de sílica, tendo seletividade usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel [93].

Na Figura 7 é apresentado um esquema do procedimento de extração em fase sólida. Na etapa A, ocorre a ativação e condicionamento do cartucho; na etapa B, ocorre a aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; na etapa C, ocorre a troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*) e, por último, na etapa D ocorre a troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

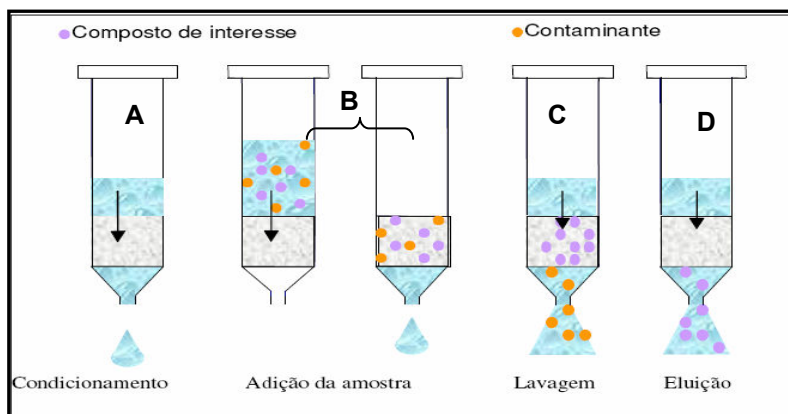
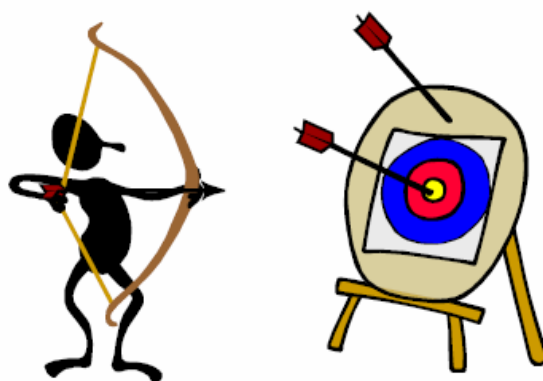


Figura 7 - Principais etapas empregadas em extração por fase sólida (EFS).

Fonte: [87]

Na prática, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com um pequeno vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Após a drenagem de toda a fase líquida, os analitos de interesse ficarão retidos na fase sólida do cartucho. O analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito pré-concentrado, ou seja, com a concentração apropriada para a análise [88].

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO



4.VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nenhuma análise química, automatizada ou manual, fornece resultados isentos de erro. Geralmente, os resultados são reportados em forma de valores numéricos que contêm informações que devem ser corretamente interpretadas e avaliadas, de acordo com as especificações do método e as necessidades de cada usuário do mesmo resultado [93]. Neste contexto, dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico, ou mesmo a adaptação de um método já existente, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [94].

Segundo o INMETRO [95], a validação de um método de ensaio é a denominação que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida. O processo de validação de métodos analíticos desenvolvidos em laboratórios é efetuado após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos. Para Barros [96] a validação do método analítico permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [97] e que envolve várias etapas. A NBR/ISO IEC 17025 [98] define que um processo de validação deve incluir a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método. Todo processo de validação deve ser abrangente o suficiente, de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos [97].

Existem vários órgãos internacionais responsáveis por processos de validação, que estabelecem muitos conceitos e procedimentos sobre este processo, gerando um grande volume de informações. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os responsáveis por processos de validação. Estes órgãos disponibilizam guias, diretrizes ou mesmo normas, para o procedimento de validação de métodos analíticos.

No Quadro 3 são apresentados os principais critérios utilizados para a validação de métodos segundo os mais reconhecidos órgãos de regulamentação, nacionais e internacionais.

Quadro 3 - Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO	ICH	USP	IUPAC
Especificidade/Seletividade	x	x	x	x	x ¹
Faixa de trabalho e Faixa linear	x	x	x	x	x
Linearidade	x	x	x	x	x ¹
Limite de Detecção	x	x	x	x	x
Limite de Quantificação	x	x	x	x	x
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	-	-	-	x
Exatidão e tendência	x ¹	x	x ¹	x ¹	x
Precisão (repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade)	x ²	x	x ¹	x ¹	x
Robustez	x	x	x	x	x
Incerteza de medição	-	x	-	-	x

¹ - Realiza calibração; ² - Não realiza tendência

Os principais parâmetros utilizados para a validação de métodos cromatográficos são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez [97]. A Figura 8 mostra um fluxograma com as etapas do procedimento analítico para a validação do método para análise de resíduos de sulfonamidas em mel proposto neste trabalho.

4.1 FAIXA DE APLICAÇÃO

A faixa de aplicação de um método refere-se ao intervalo entre a concentração superior e inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade [99].

Na prática a faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, e é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão [99].

Segundo Thompson *et al.* [100], a IUPAC estabelece duas faixas de aplicação, uma para impurezas (0-150%) e outra para macro-componentes (50-150%), sendo que o valor esperado deve estar contido dentro de uma destas duas faixas. A AOAC [101] recomenda que, para análise de traços, a faixa seja compreendida entre o limite de quantificação e duas ou três vezes o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Na análise de fármacos, a ANVISA indica uma faixa de aplicação entre 80-120% da concentração teórica do analito, e recomenda que seja determinado intervalo linear de, no mínimo, 5 níveis de concentração diferentes [102].

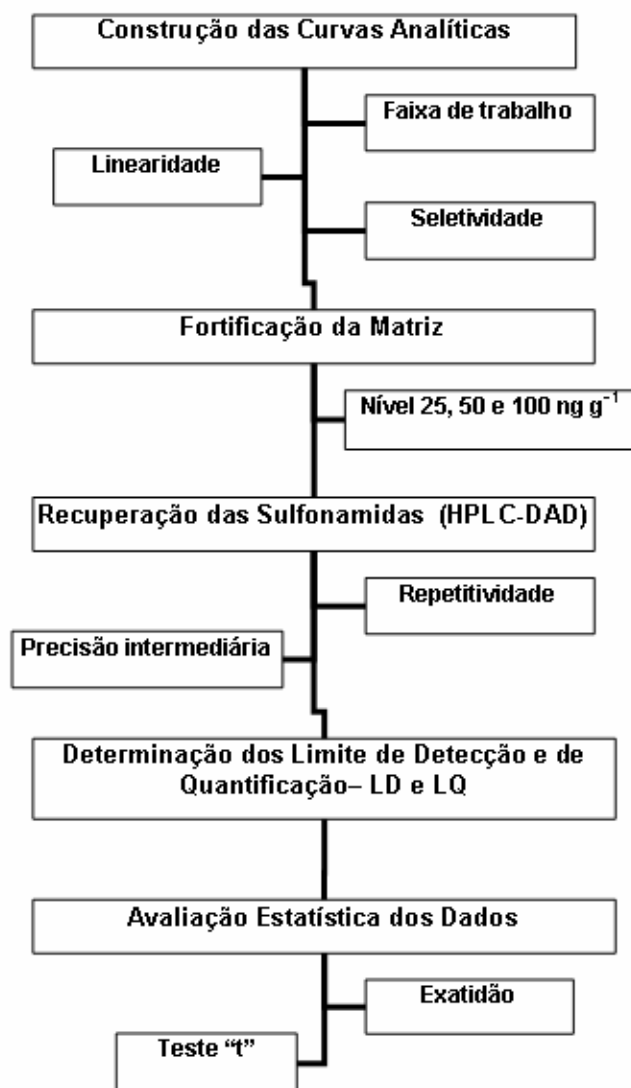


Figura 8 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação [97].

A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico [103]. Na maior parte das vezes uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito deve ser determinada empiricamente e pode ser representada como uma equação de reta, geralmente chamada de curva analítica ou gráfica de calibração, que representa a resposta de um método analítico como função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido [104].

Segundo Hubert *et al.* [105] uma outra forma de se avaliar a linearidade é por meio da relação entre concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear.

Em geral recomenda-se que o coeficiente de correlação seja maior que 0,990, sendo considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a regressão [95]. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [97].

4.3 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método analítico determinar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz [103]. A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da matriz, tais como, impurezas, ingredientes ativos, excipientes, e outros compostos de formas similares que possam estar presentes [106].

A seletividade é um parâmetro muito importante quando se trabalha com análises de multiresíduos. Deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, não sendo um parâmetro a ser realizado uma única vez, e sua realização deve ocorrer de forma contínua. Conhecer os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a análise ajuda na escolha das melhores condições para detecção. É através da seletividade que se garante que o pico cromatográfico seja o do composto em estudo [97].

4.4 PRECISÃO

A precisão refere-se à proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas [99]. Pode ser expressa pelo desvio dos resultados em relação à sua média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV) [97], conforme apresentado na equação 1.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{X}$ = média das recuperações.

Em análises de traços são aceitos valores de RSD de até 20%, já para métodos que quantificam compostos em macro-quantidades, o RSD deve ser de 1 a 2%. A precisão também pode ser melhorada através de um maior número de replicatas [107].

Comumente, a precisão de um método analítico em validação de métodos pode ser expressa como repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade [100].

4.4.1 Repetitividade

A repetitividade (ou repetibilidade) refere-se à precisão entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições, equipamentos, analistas, em um curto intervalo de tempo [99]. O INMETRO [95] recomenda sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r').

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo a mais aconselhável de ser adotada. Tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente os resultados não tenham diferença [99; 97]. O número de ensaios para a precisão intermediária segue a mesma recomendação que para a repetitividade segundo INMETRO [95].

4.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, ou seja, em localidades diferentes, utilizando um mesmo conjunto de amostras [103]. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratoriais), e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em legislações, ou farmacopéias etc... [97].

4.5 EXATIDÃO

A exatidão é estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [103]. Sempre se considera a exatidão dentro de certos limites, a um dado nível de confiança [97]. Para a ANVISA [58] e o ICH [99] é necessário um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração.

Os procedimentos mais recomendados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do analito. Para a análise de matrizes biológicas, como alimentos, os ensaios de recuperação são os mais utilizados [97; 103].

4.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação pode ser definido como a quantidade de analito presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada [100]. A recuperação está relacionada com a exatidão, porque reflete a quantidade de determinada substância recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra [103].

Na prática, o estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, também sendo denominada de fortificação. A equação 2 apresenta a relação utilizada para os cálculos da percentagem de recuperação.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

Na Figura 9 é mostrado o esquema proposto por Brito [108] para representar o processo de fortificação.

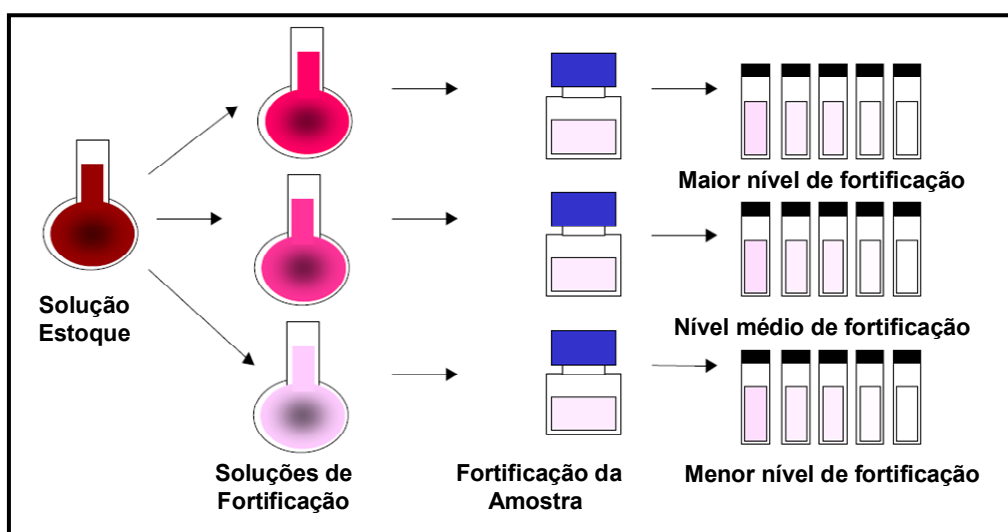


Figura 9 - Processo de fortificação das amostras.
Fonte: [108]

A limitação do procedimento de recuperação baseia-se no fato de que a substância adicionada não se apresenta na mesma forma que a encontrada originalmente na amostra, devendo-se ter o cuidado de reproduzir ao máximo as condições originais da amostra. Outro fator limitante para os ensaios de recuperação é o efeito da matriz, uma vez que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, sendo necessário investigar e eliminar estes efeitos dos interferentes [104].

Para garantir que os resultados sejam confiáveis é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, devendo-se avaliá-la na faixa de concentração esperada do composto de interesse [97].

Segundo a Comunidade Européia [109] os intervalos aceitáveis para recuperação em análises de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Contudo, em função da complexidade da composição da amostra esta faixa de variação pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 35\%$.

No estudo de recuperação também são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de *Student* de acordo com a equação 3. Se o valor “t” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato.

$$t_{calc} = \frac{(\text{Rec} - 100)}{s_{rec} / \sqrt{(n-1)}} \quad (3)$$

Onde: Rec é a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 é a recuperação percentual desejada; n é o número de determinações (em geral, um mínimo de 5 repetições); s_{rec} é o desvio padrão nas recuperações.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual para a determinação do limite de detecção, pelo método da relação sinal/ruído e por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica [97].

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração detectável em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas; S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*).

4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas [97]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [103].

A determinação do valor do limite de quantificação do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a validação dos resultados, tornando o método menos preciso [110]. Concentrações maiores para o limite de quantificação deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão [96].

O limite de quantificação também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o limite de detecção, sendo que para o limite de quantificação a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e, a equação utilizada é demonstrada na equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

5. MATERIAIS E MÉTODO



5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do método para a determinação de sulfonamidas em amostras de mel cinco etapas foram planejadas. A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a revisão bibliográfica sobre a ocorrência de sulfonamidas em alimentos e mel de forma a reunir dados científicos e literatura para oferecer suporte no desenvolvimento do método. A segunda etapa consistiu no estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas para a análise quantitativa. Uma vez otimizados os parâmetros cromatográficos estes foram fixados e em seguida foram obtidas curvas analíticas dos compostos. Na terceira etapa foi feito um estudo de pré-tratamento da amostra utilizando hidrólise ácida e também foram estabelecidas e otimizadas as condições de extração em fase sólida. As amostras usadas nesta etapa foram às coletadas na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA. Na quarta etapa procedeu-se à validação do método proposto. A última etapa foi realizada pela aplicação do método, utilizando-se amostras de méis comerciais coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins.

5.1.1 Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas

As amostras de mel foram coletadas no apiário Turimel, localizado na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA que está localizada na região do Alto Turu, no estado do Maranhão, às margens da BR 316. A área total do município é de 904, 95 km², localizando-se próximo à fronteira do Estado do Pará, a 420 quilômetros da capital do Maranhão, São Luís.

Segundo apicultores do local a flora comumente visitada pelas abelhas da região inclui as seguintes plantas (nomes populares): chanana, assa-peixe, vassourinha de botão, hortelãzinho, bamburral, juçara, embaúba, maria-mole, cajueiro, laranjeira e seringueira.



Figura 10 – Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.

Fonte: adaptado de [111]

A coleta das amostras para o desenvolvimento do método foi realizada no mês de setembro de 2007. O critério estabelecido para a coleta das amostras a serem utilizadas para o desenvolvimento do método foi a ausência de resíduos de fármacos e outros resíduos de contaminantes. Optou-se por fazer a coleta neste apiário após análise do histórico produtivo do apiário, onde se evidenciou a preocupação com a qualidade do produto. O apiário, atualmente, está buscando certificação orgânica, fato este que serve como indício de que o mel produzido neste apiário seja livre de resíduos de contaminantes.

Foram coletados 30 kg de mel e estes foram armazenadas em frascos de vidro envoltos por papel alumínio a fim de evitar degradação de alguns compostos por ação da luz. Outro cuidado tomado com as amostras foi manter uma vedação dos frascos eficiente, visando impedir a entrada de ar e início de possíveis processos fermentativos. As amostras foram conservadas a temperatura ambiente.

Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para o início das atividades de pesquisa.



Figura 11 - (a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.

5.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram:

5.2.1 Padrões

- Sulfadiazina (SDZ) – Sigma Aldrich, com pureza de $\geq 99\%$;
- Sulfadimetoxina (SDM) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfadimidina (SDD) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfatiazol (STZ) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% .

5.2.2 Reagentes e Solventes

- Metanol (HPLC solvent Merck-Germany);
- Acetonitrila (HPLC solvent Merck-Germany);
- Água ultra pura (Milli-Q), sistema Millipore;
- Acetato de Sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) M.M. 136,09 - Merck-Germany ;
- Ácido Acético Glacial P.A. (CH_3COOH)- M.M 60,05 - Merck-Germany.

5.2.3 Dispositivos para Extração por Fase Sólida

- Octadecil silano (C_{18}): cartucho - C_{18} – 500 mg/6mL – AccuBON^{II}ODS – Agilent Technologies;

- Octil silano (C₈): cartucho - Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- Cartucho: ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian.

5.2.4 Coluna Cromatográfica

- Coluna cromatográfica analítica - Phenomenex – 150mm x 4,0 µm d.i, recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica.
- Coluna de Guarda para coluna C-18 – Phenomenex, KJ0-4282.
- Coluna cromatográfica analítica C₈ - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb-Varian.

5.2.5 Equipamentos

- Balança eletrônica, modelo Bel Mark 210A, faixa de pesagem de 10mg-210g – Bell Engineering, Italy;
- Banho ultra-som USC 1450 – Unique Thorton, Brasil;
- Bomba de vácuo – Marconi, modelo MA058, Brasil;
- Cromatógrafo a Líquido marca Varian (EUA), composto por:
 - Bombas de alta pressão - binária - Varian Polaris ProStar 210/210;
 - Injetor manual, loop 20µL - Rheodyne;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, Varian Polaris ProStar 335 – Varian (EUA);
 - Computador Digital, Intel Core 2, 2,4 GHz, HD 160 Gb, com impressora HP Deskjet D 4160;
- Deionizador de água – Milli-Q Academic System – A10, sistema Millipore (EUA);
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian (EUA);
- Rotaevaporador – Fisatom – Brasil, modelo 802;
- pHmetro Hanna Instruments, com eletrodo de pH HI 1110B (vidro combinado) modelo pH 21, Brasil;

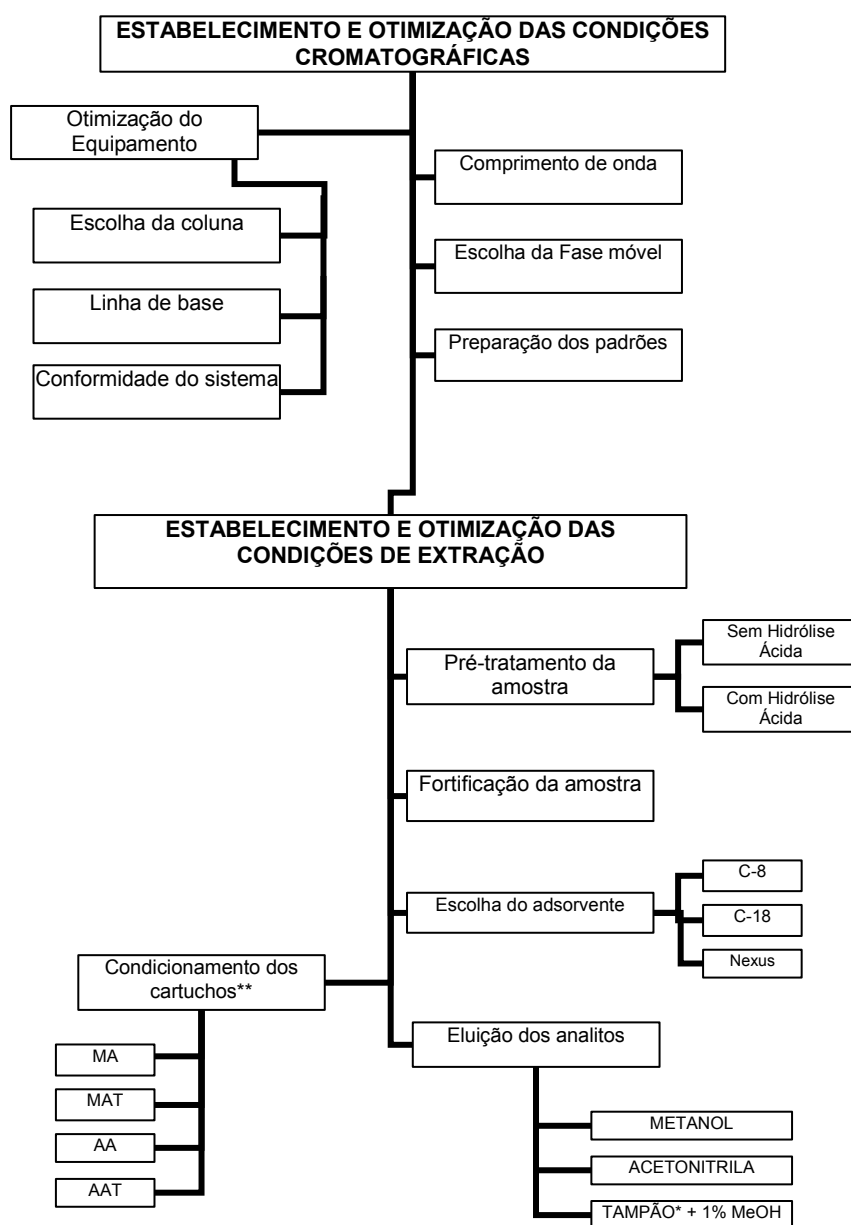
5.2.6 Outros materiais

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0 e 1000,0 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 10 e 100 mL;
- Espátula de aço inox;
- Membrana Acetato de celulose, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - SartoriusMerck;
- Membrana de Vidro, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - Merck
- Detergente Extran – Merck;
- Outros materiais de laboratório (Becker, proveta, micro pipetadores (100-1000 µL e 10-100 µL), funil de separação, pipeta, pipeta de *Pasteur*);
- Sistema de extração a vácuo (*manifold*), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (EUA).
- Gás nitrogênio (N₂) – *White Martins* (Brasil);

5.3 MÉTODO

Os métodos de análises de resíduos de sulfonamidas são desenvolvidos para atender as análises de analitos individuais e análise simultânea de vários resíduos, denominadas “análise multiresíduo”. O desenvolvimento de métodos multiresiduais, em geral, são muito trabalhosos, uma vez que são determinados analitos com características diferentes sofrendo também interferência dos constituintes da matriz que normalmente interferem na análise.

A Figura 12 mostra um fluxograma com a visão geral das etapas do procedimento analítico para o estabelecimento das condições cromatográficas e condições para as extrações.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

** MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.

Figura 12 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.

5.3.1 Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas

A primeira etapa para o estabelecimento das condições cromatográficas consistiu na otimização do equipamento, onde foram realizados os experimentos para escolha da coluna, linha de base e conformidade do sistema (de acordo com os critérios citados por SHABIR,

[113]). O estudo das condições cromatográficas compreendeu seleção do comprimento de onda, escolha da composição da fase móvel e solvente para preparação das soluções-padrão.

5.3.1.1 Seleção da coluna

Para a análise das sulfonamidas foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octilsilano C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb -Varian) e a outra contendo uma fase estacionária octadecilsilano C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm - Phenomenex).

5.3.1.2 Linha de Base do Solvente

É o sinal obtido pelo sistema cromatográfico detector DAD, mais a coluna utilizada com a injeção do solvente. O sinal da linha de base foi obtido injetando-se 20 µL de metanol, um dos solventes a ser utilizado nos procedimentos de desenvolvimento e validação do método. Este teste também forneceu informações sobre o grau de pureza do mesmo, que deve ser grau resíduo (CLAE), necessário para análise de traços de fármacos, com um mínimo de impurezas possível.

5.3.1.3 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada na etapa de otimização do equipamento, assim como no desenvolvimento e validação do método. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção (k'), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critérios de aceitação foram utilizados os parâmetros recomendados por Shabir [113], conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Limites
Fator de retenção (k')	$1 < k' < 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$
Número de pratos teóricos da coluna sendo usada (N)	$N/m > 8000$

Fonte: adaptado de [113].

5.3.1.4 Seleção do Comprimento de onda

Foram realizados dois testes para obtenção dos espectros de absorção, um utilizando espectrofotômetro modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) e outro usando o próprio detector do cromatógrafo (ProStar 335 - Varian). Os espectros de absorção obtidos no espectrofotômetro corresponderam a uma varredura de 190 a 300 nm e a varredura feita no detector do cromatógrafo correspondeu a 250 a 280 nm. O comprimento de onda correspondente à absorbância média dos analitos foi posteriormente utilizado para a determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos.

5.3.1.5 Seleção da fase móvel

Para a análise cromatográfica (CLAE) dos analitos foram testados seis tipos de fases móveis, no modo gradiente.

O preparo dos solventes para a fase móvel consistiu na filtração em kit para filtração com membrana de porosidade 0,45 µm para solventes, orgânicos e água, e desgaseificação em banho ultra-som por 20 minutos para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em garrafas próprias para solventes e foram rotuladas com informações a respeito da sua composição e o valor do pH. Antes do início dos trabalhos as soluções permaneceram no banho ultra-som por 10 minutos para a retirada de gases dissolvidos.

5.3.1.6 Preparação dos padrões

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas, individualmente, pela dissolução dos padrões em metanol. Pesou-se em balança analítica 0,0010g da sulfonamida e solubilizou-se cada uma em metanol, completando-se o balão para 0,01 L de solução. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar rotulado e com tampa de rosca para ser estocado. As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4°C, para evitar degradação dos padrões.

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o teste a ser realizado. Foram utilizados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho: solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 4,5 e solução aquosa de ácido acético 0,1%. As soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações e usadas para fortificação das amostras e para preparo das soluções padrão em extrato para os testes de recuperação e linearidade.

Os padrões foram injetados individualmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após conhecido o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos (solução contendo uma mistura dos quatro padrões – solução mix, a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

5.3.2 Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração

Os métodos de análises cromatográficas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. A etapa de extração em geral é o ponto crítico da análise, por ser responsável por erros nos resultados. As etapas de estabelecimento e otimização das condições de extração consistiram no pré-tratamento da amostra (hidrólise ácida), escolha do adsorvente (C8, C18 e Nexus), condicionamento dos cartuchos (metanol:água; metanol:água:tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5); acetonitrila:água; acetonitrila:água: tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5) e escolha do solvente para eluição (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 com adição de 1% de metanol).

5.3.2.1 Pré-tratamento da amostra

O mel é uma amostra complexa composta por várias substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes. Para diminuir o efeito da matriz na análise cromatográfica alguns trabalhos na literatura sugerem uma etapa de hidrólise ácida antes da extração a fim de romper possíveis ligações de interferentes com os analitos de interesse.

No presente trabalho, foram realizados vários testes para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. A massa de mel foi fixada em 1,0 g, de forma a diminuir o número de variáveis a serem testadas. Os parâmetros estudados

foram: concentração do ácido, volume de ácido a adicionar, tempo de hidrólise e forma de agitação. Na Tabela 5 são apresentados os testes realizados.

Tabela 5 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

A etapa de hidrólise ácida propriamente dita consistiu na adição de um volume de ácido em 1,0 g de mel. A solução de mel (extrato) foi levada para agitação por um determinado tempo. Após a hidrólise ácida os extratos hidrolisados de mel tiveram seu pH ajustado para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e solução tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5. Os extratos de mel após ajuste do pH foram filtrados em membrana de filtração (membrana de acetato de celulose) para retirada de quaisquer partículas que possam estar presentes no extrato.

5.3.2.2 Seleção do adsorvente

Visando obter uma melhor recuperação do analito, três adsorventes foram avaliados, sendo eles:

- EFS Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- EFS ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian;
- EFS C₁₈ – 500 mg/6mL – AccuBOND^{II}ODS – Agilent Technologies.

5.3.2.3 Condicionamento dos cartuchos

Os solventes testados para o condicionamento do cartucho e suas proporções foram:

metanol:água (1:1); metanol:água:tampão (1:1:1); acetonitrila:água (1:1); e acetonitrila:água:tampão (1:1:1).

5.3.2.4 Eluição dos analitos

Para verificar a melhor condição de extração das sulfonamidas foram testados três solventes para eluição, sendo eles: metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5 com adição de 1% metanol.

5.3.2.5 Extração por EFS

A fortificação das amostras para os estudos de extração consistiu na adição de volumes de solução padrão dos analitos no mel, de forma que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 µL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L⁻¹.

Os cálculos realizados foram realizados do seguinte modo: para se obter a concentração de 0,10 mg L⁻¹ das quatro sulfonamidas em 1000 µL de solução final, por exemplo, necessita-se de $10 \times 10^{-3} \text{ mg}$ $\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1} \right)$.

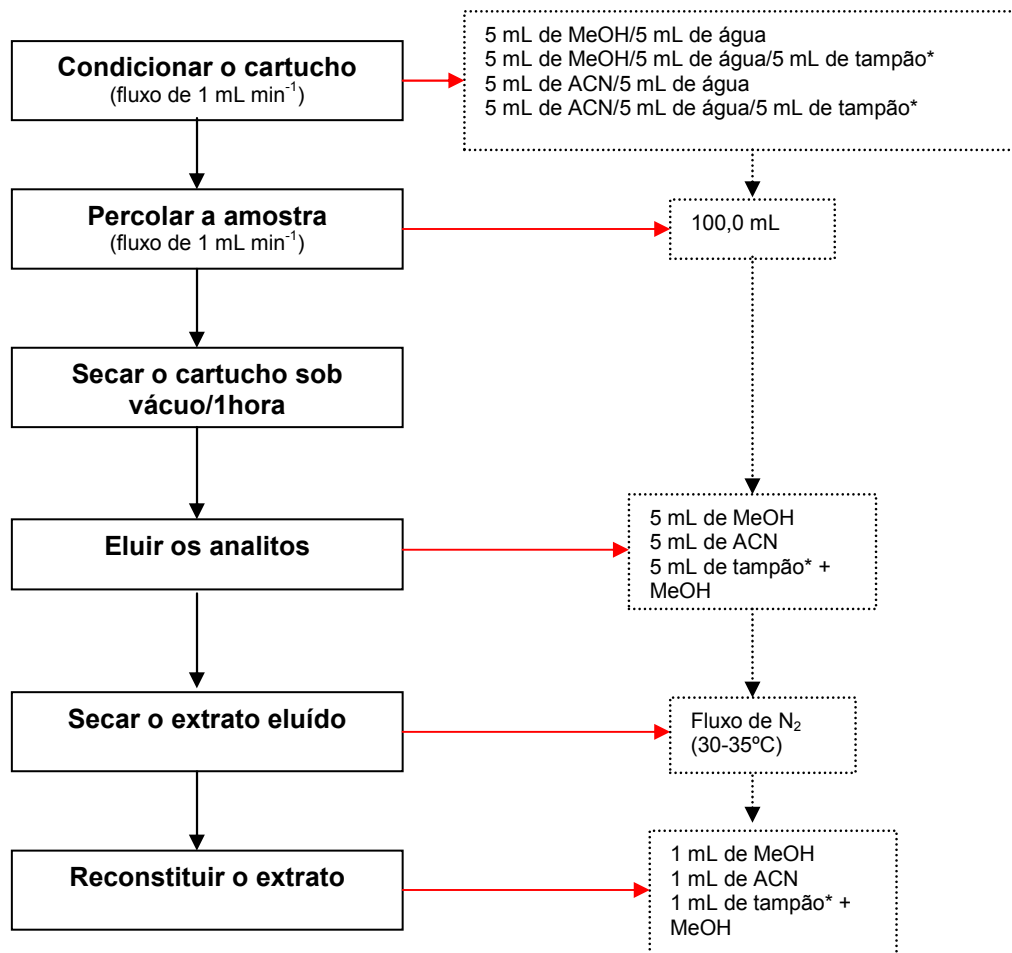
Como foi percolado um volume de 100,0 mL de extrato de mel hidrolisado enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 0,10 mg L⁻¹

$\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow C = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ mg}}{100 \times 10^{-3} \text{ L}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \right)$. Partindo-se de uma solução estoque de 1,0 mg L⁻¹,

o volume da solução padrão mista a ser adicionado no extrato de mel é de 10 mL $\left(C_{\text{padrão}} \cdot V_{\text{padrão}} = C_{\text{amostra}} \cdot V_{\text{amostra}} \rightarrow 1,0 \text{ mg L}^{-1} \times V_{\text{padrão}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 100 \text{ mL} \rightarrow V_{\text{padrão}} = 10 \text{ mL} \right)$.

Para a extração das amostras, testemunha e fortificada, foram realizadas utilizando-se sistema de extração (Manifold) sob vácuo. Antes da percolagem da amostra através do cartucho este foi condicionado com solventes, vazão de fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0 mL da amostra (fluxo de 1 mL min⁻¹), os cartuchos foram secos sob vácuo por 45 minutos. Procedeu-se a eluição dos analitos com 5 mL de solvente, em seguida os analitos eluídos foram secos sob N₂ a temperatura ambiente e posteriormente retomados com 1000 µL de solvente. Os extratos foram em seguida injetados para análise cromatográfica.

A Figura 13 mostra um esquema com as etapas do procedimento analítico para os testes de extração para determinação de sulfonamidas em mel.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

Figura 13 - Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração EFS.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA [60] e Comunidade

Européia (*EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE*) [109] para análise de resíduos em alimentos.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se testes em quintuplicata, de padrões e amostras testemunhas, com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada sulfonamida.

5.4.2 Linearidade

A região linear de resposta do detector foi determinada através de cálculo de regressão linear da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções-padrão assim como com amostras testemunhas fortificadas nas mesmas concentrações que as soluções-padrão. As soluções foram preparadas a partir de uma solução intermediária de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram injetadas cinco vezes. As concentrações utilizadas para o estudo das sulfonamidas foram: 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa linear de trabalho). Construiu-se o gráfico de calibração para os compostos estudados, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo x e os valores das áreas dos picos no eixo y.

A linearidade e a sensibilidade do método foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica. A linearidade foi expressa como o coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

5.4.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O Limite de detecção (LD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas. Para isso, foram estabelecidas as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. O Limite de quantificação (LQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas.

Determinou-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse para calcular os limites de detecção e de quantificação.

5.4.4 Estudo de recuperação

Os estudos de recuperação foram utilizados para avaliar o método quanto à precisão e exatidão; este foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 5.5).

O procedimento experimental consistiu da adição de volumes da solução padrão no mel, para que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 μL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L^{-1} .

5.4.4.1 Precisão

Foram realizados dois testes quanto à precisão do método. Verificou-se a precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de duas amostras de mel fortificadas a concentração de 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, os testes foram realizados em quintuplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Já a precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de duas amostras de mel em 3 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 25, 50 e 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

5.4.4.2 Exatidão

Os resultados e as conclusões com os dados obtidos do método analítico foram submetidos à avaliação estatística, e a expressão dos resultados foi apresentada em um determinado intervalo de confiança relacionado com os valores de exatidão e precisão dos resultados. Aplicou-se o teste “t” *de Student* nos resultados.

5.5 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras comerciais de mel, coletadas no Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (estados vizinhos ao Maranhão). Na Figura 14 é apresentado um esquema com o método proposto para a determinação de sulfonamidas em mel.

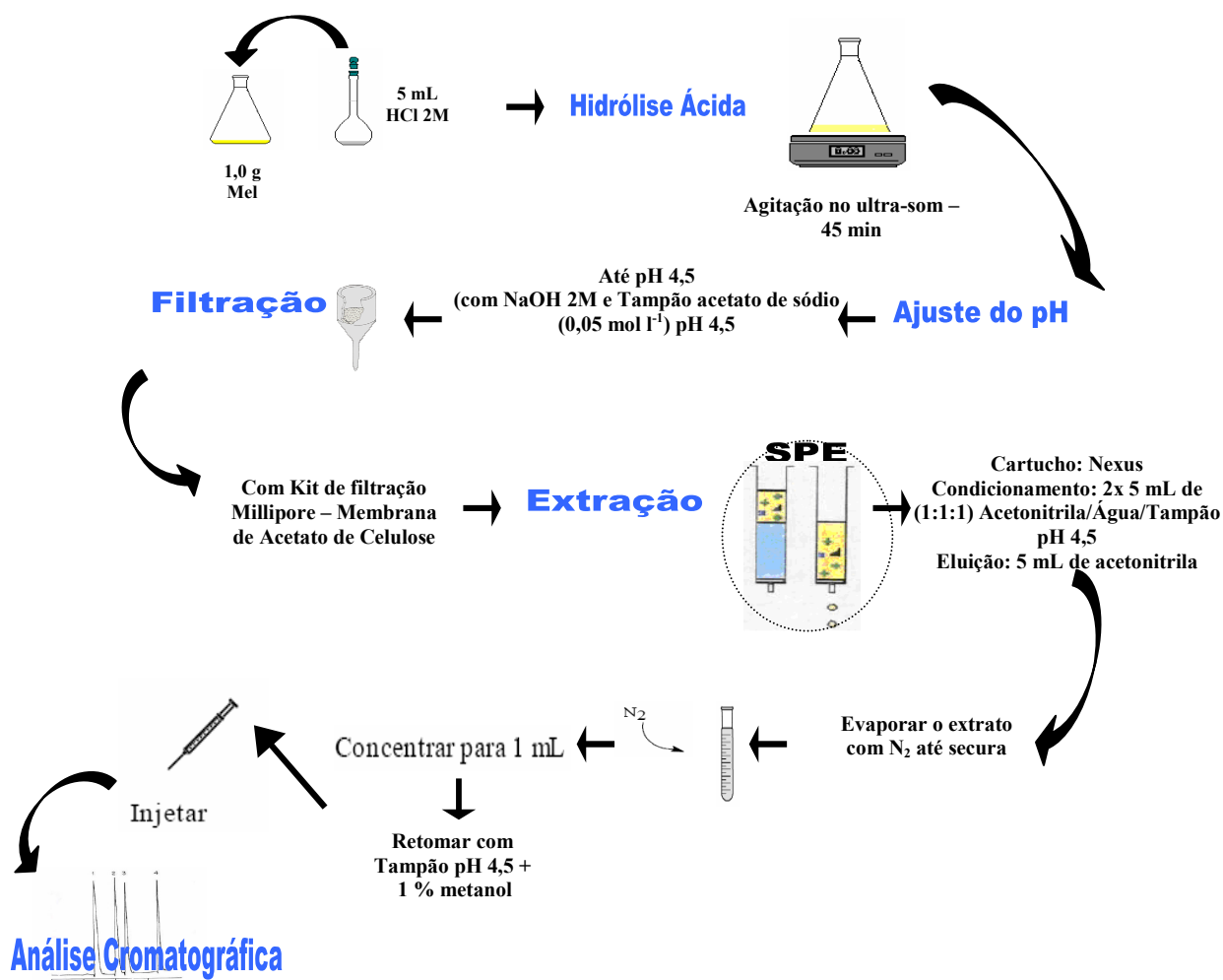


Figura 14 - Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por ZOTOU e VASILIAOUDOU [11] para a determinação de sulfonamidas em mel por HPLC-DAD que emprega solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6; como fase estacionária a coluna C18 e fase móvel: metanol e solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6, com adição de 1% de ácido acético, no modo isocrático. Os autores realizaram testes de extração em fase sólida com vários cartuchos e solventes para eluição. Para a etapa de extração foi utilizado o método recomendado por MAUDENS *et al.* [63] como referência inicial, que utilizou hidrólise ácida com ácido clorídrico 2M e extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C18.

6.1 SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Na Tabela 6 são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 300 nm para as sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram posteriormente selecionados na determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos. Os testes foram realizados com as sulfonamidas com concentração em 1 mg L⁻¹ em metanol.

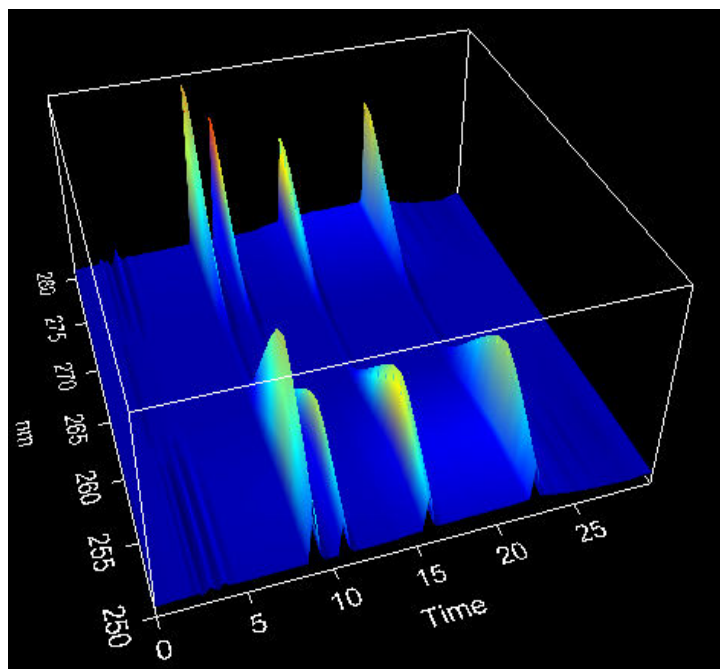
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.

Composto	λ máx (nm)
Sulfadiazina	270
Sulfadimetoxina	272
Sulfadimidina	269
Sulfatiazol	260

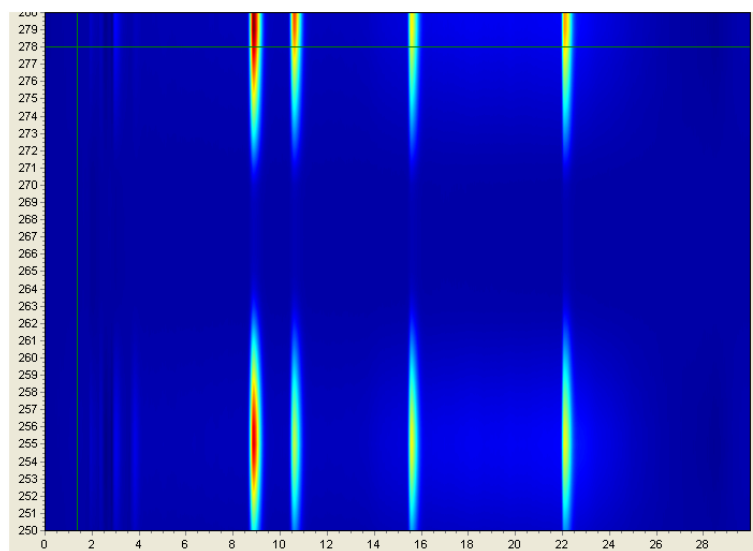
Nas Figuras 15 (a e b) e 16 (a e b) são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção na região do UV (250-280 nm) e os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda na região UV em estudo.

Os resultados encontrados em ambos os equipamentos confirmam o comprimento de onda de máxima absorção, 278 nm, para a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e

sulfadimetoxina. Para sulfatiazol, embora a máxima absorção não ocorra em 278 nm, resultados satisfatórios foram obtidos neste comprimento de onda, justificando a escolha deste comprimento de onda para os quatro compostos em estudo.

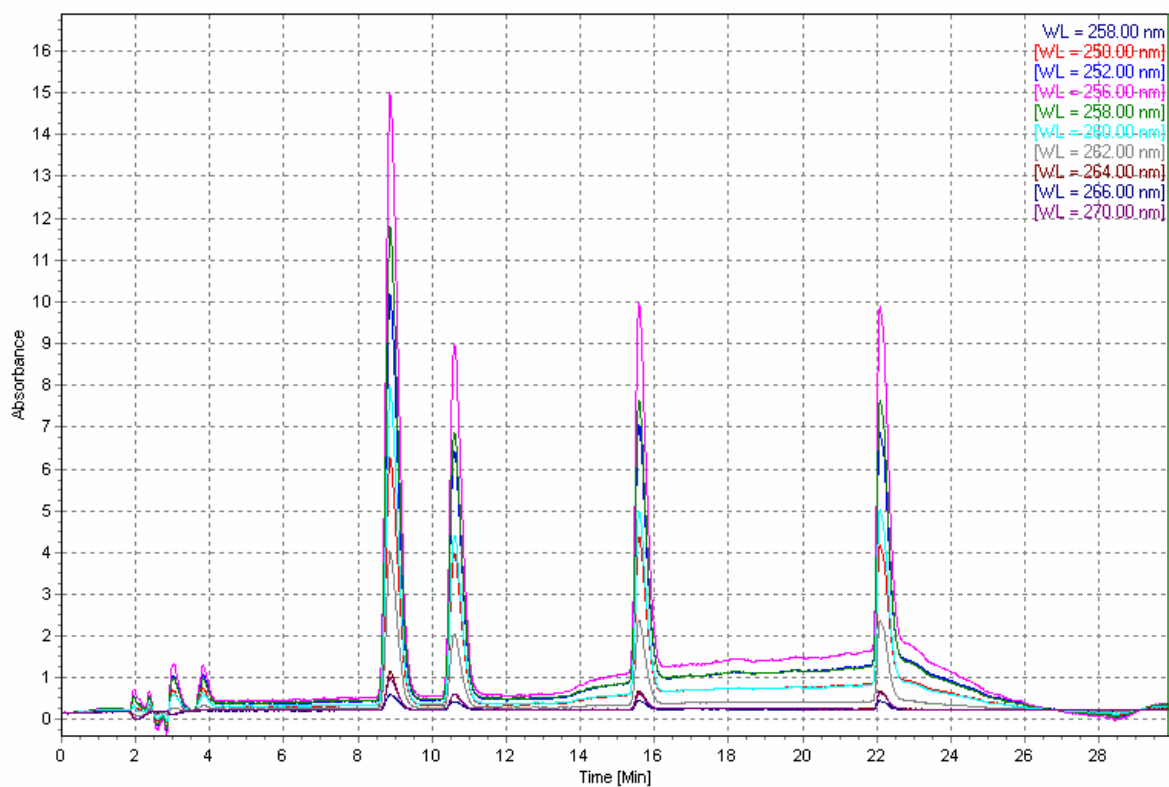


(a)

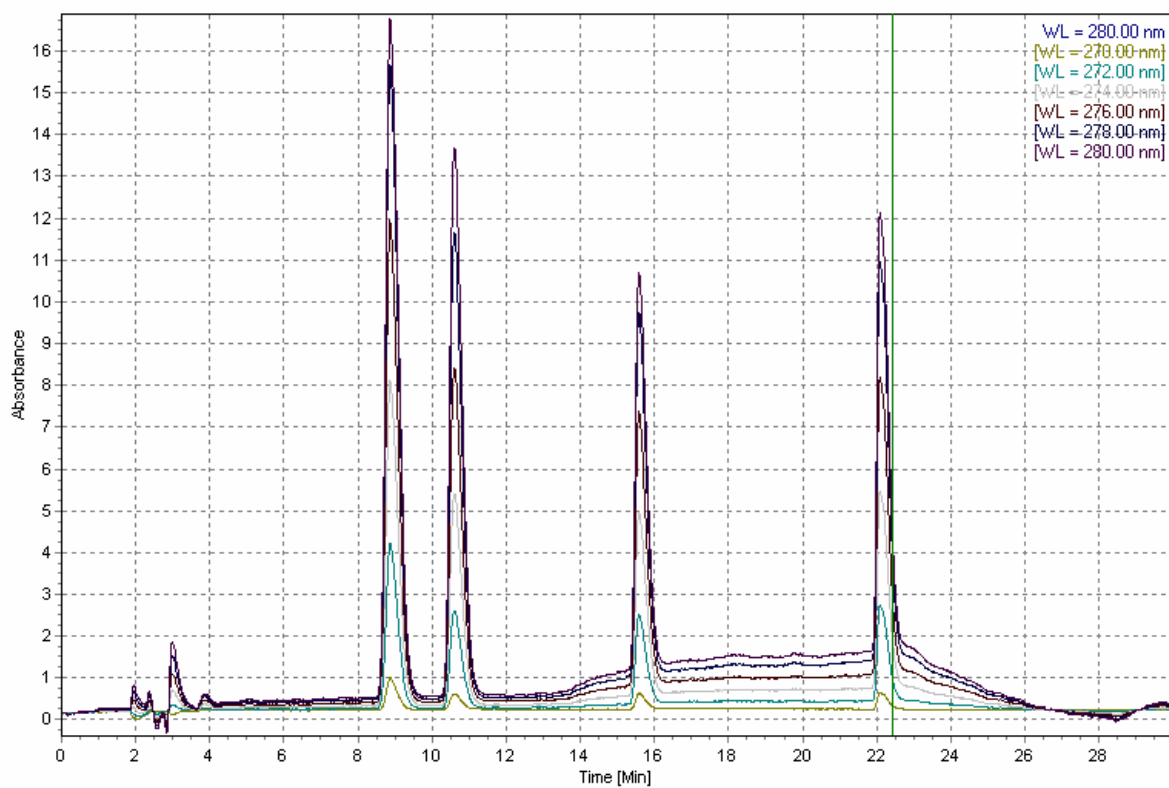


(b)

Figura 15 - Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.



(a)



(b)

Figura 16 - Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatográfico: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm

6.2 SELEÇÃO DA COLUNA

Para se obter uma melhor separação cromatográfica foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas duas colunas analíticas, uma com fase C_8 (mais polar), e com uma coluna C_{18} (menos polar). Com ambas as colunas obteve-se uma boa resolução e boa separação dos compostos de interesse. A Figura 17 mostra uma sobreposição dos cromatogramas resultantes da injeção da mistura dos padrões em concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Selecionou-se a coluna C_{18} em função dos maiores valores de áreas dos picos das sulfonamidas, confirmando-se os dados encontrados na literatura que citam maior utilização da coluna C_{18} .

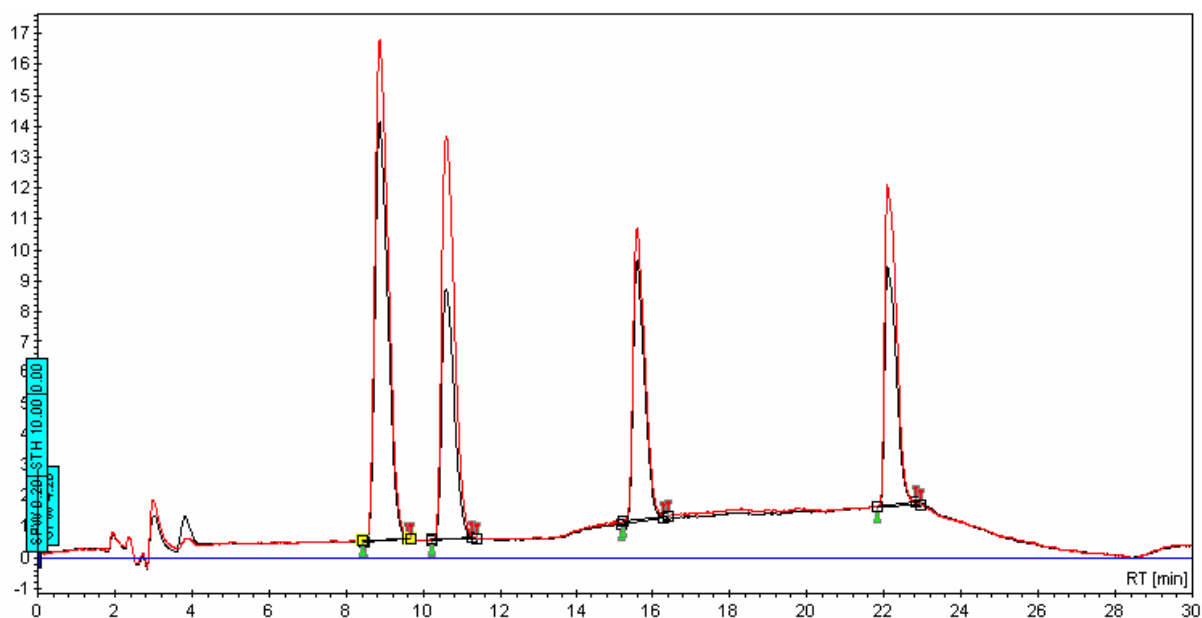


Figura 17 - Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando C_{18} (cromatograma vermelho), C_8 (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).

6.3 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é muito importante na separação dos analitos devido à interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a proporcionar uma resolução adequada dos analitos, boa separação, menores tempos de

retenção, mantendo, entretanto, a solubilidade dos analitos no decorrer da separação cromatográfica e, principalmente, sem interferir na detecção dos analitos de interesse.

6.3.1 Seleção do pH da fase móvel

As sulfonamidas estudadas apresentam caráter anfótero (solubilidade entre 1 e 192 mg/100mL de água a 27°C) e valores de pK_a entre 6,21 e 7,45. Vários trabalhos na literatura apontam o uso de solução-tampão de acetato de sódio (pH 4,5) na fase móvel, justificando que seu uso mantém as espécies iônicas estáveis no decorrer das análises. A escolha do pH da solução-tampão constitui-se, então, em um fator importante. Foram feitos testes para verificar em qual pH as sulfonamidas estudadas teriam a melhor resposta no detector DAD. Os valores de pH testados foram: 3,5; 4,5 e 5,5, como apresentado na Figura 18. Para a realização dos testes de pH utilizou-se acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Em todos os valores de pH obteve-se boa separação e resolução. Entretanto, em pH 4,5 melhores resultados foram obtidos, quando se comparando as áreas dos picos nos três valores de pH.

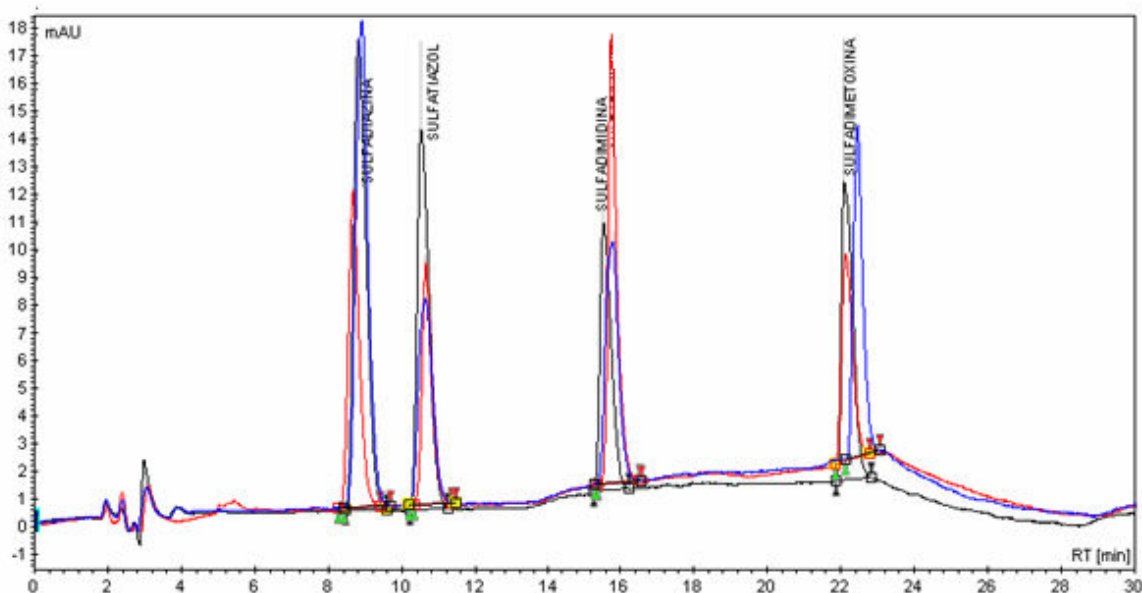


Figura 18 - Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto)

6.3.2 Composição da fase móvel

No Quadro 4 são apresentados os testes realizados no estudo da composição da fase móvel.

Teste	Gradiente			Composição da Fase móvel	
	t (min)	%	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
Teste 1	0	10:90	1,0	Metanol	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 2	0	10:90	1,0	Metanol	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 3	0	10:90	1,0	Metanol	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 4	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 5	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 6	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			

*t – tempo em minutos; % - proporção de solvente

Quadro 4 - Testes para seleção da composição da fase móvel

Quando metanol foi empregado na fase móvel, independente da composição da fase aquosa, não foi possível observar todos os picos das sulfonamidas injetadas. Em todos os

testes em que foi utilizado este solvente, observou-se somente os picos da sulfadiazina, sulfatiazol e sulfadimidina, não sendo identificando sinal para sulfadimetoxina. Este fato pode ser explicado em função do poder de arraste do metanol, que não deve ter sido suficiente para detectá-la nas condições estabelecidas. Os resultados dos testes feitos com tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e solução de ácido acético 0,1% apresentaram áreas dos picos maiores que as obtidas quando utilizando água na fase móvel. Na Tabela 7 são apresentados a quantidade e os respectivos compostos separados no estudo da composição da fase móvel. Os cromatogramas típicos obtidos com os melhores resultados para cada teste de composição da fase móvel são apresentados nas Figuras 19, a e b.

Para os testes empregando-se acetonitrila, melhores resultados foram encontrados para todas as composições da fase móvel. Utilizando-se ACN: solução de ácido acético 0,1% e ACN: tampão acetato de sódio pH 4,5, resolução e separação adequadas foram observadas para as quatro sulfonamidas. Acetonitrila e água apresentaram melhores resultados sendo, assim, selecionados como os solventes adequados para a fase móvel (Figura 19 - b).

No ANEXO 03, são apresentados todos os cromatogramas dos testes realizados nos estudos da composição da fase móvel.

Tabela 7 – Estudo da composição da fase móvel.

Teste	Quantidade de compostos separados	Compostos separados
01 (MeOH:H ₂ O)	03	SDZ, STZ, SDD
02 (MeOH:TAMPÃO)	03	SDZ, STZ, SDD
03 (MeOH:ÁGUA ÁC 0,1%)	03	SDZ, STZ, SDD
04 (ACN:H ₂ O)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
05 (ACN:TAMPÃO)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
06 (ACN: ÁGUA ÁC 0,1%)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM

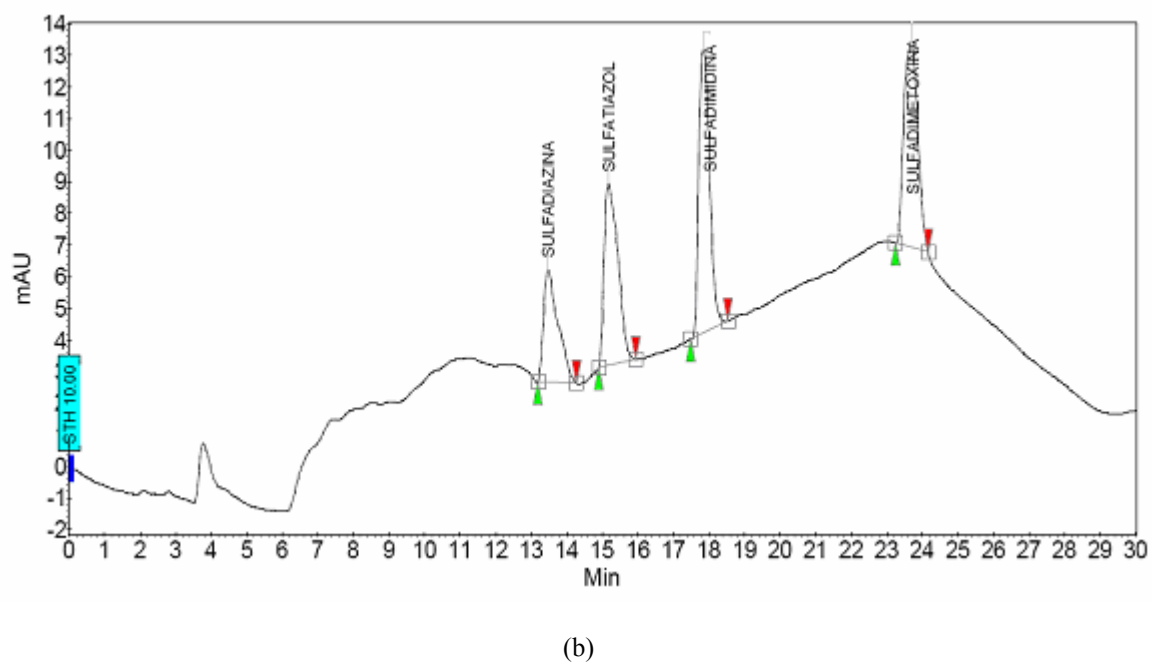
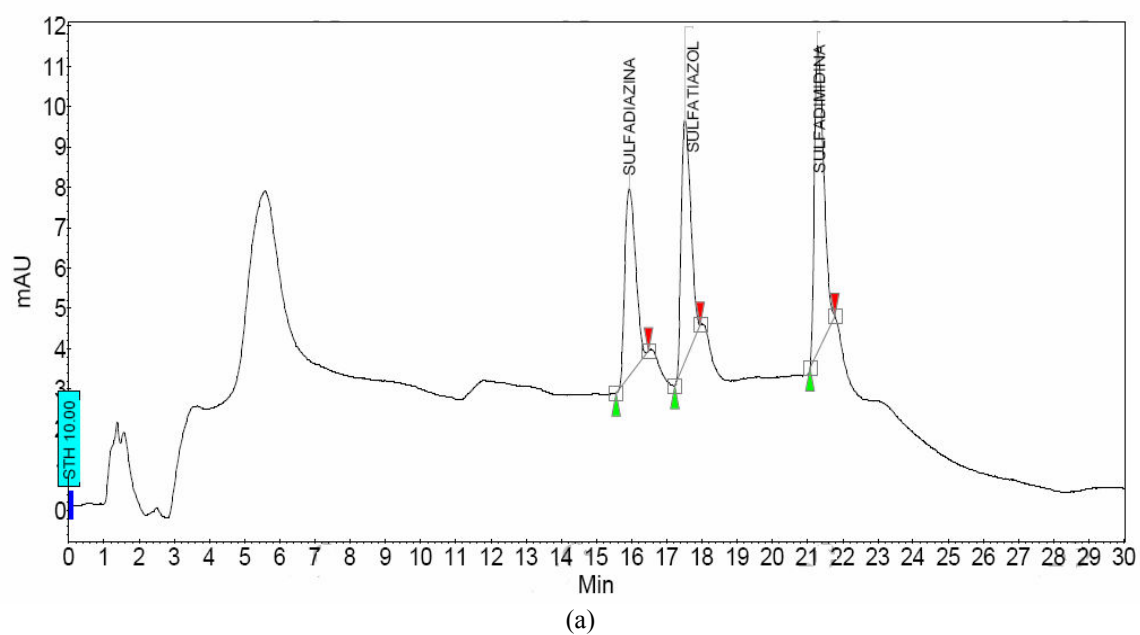


Figura 19 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água

6.3.3 Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho

As sulfonamidas são compostos ligeiramente solúveis em água, e apresentam maior solubilidade em soluções ácidas ou básicas e em solventes orgânicos [9]. Segundo Sun *et al.* [9], a solução de ácido acético 0,1% quando utilizada como solvente para as soluções de trabalho, proporciona picos cromatográficos mais definidos. Para Pecorelli *et al* [18], as soluções de trabalho devem ser preparadas usando-se solução tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, uma vez que favorecem a estabilidade das sulfonamidas.

Para se obter resolução e separação cromatográfica adequadas foram testados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho. Dois testes foram realizados, utilizando-se solução-tampão de acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e utilizando-se solução de ácido acético 0,1%. Para ambos os solventes foram obtidos resultados satisfatórios, entretanto, a solução tampão (Figura 20) forneceu maiores áreas dos picos cromatográficos, tendo-se optado por este solvente para a realização das demais análises.

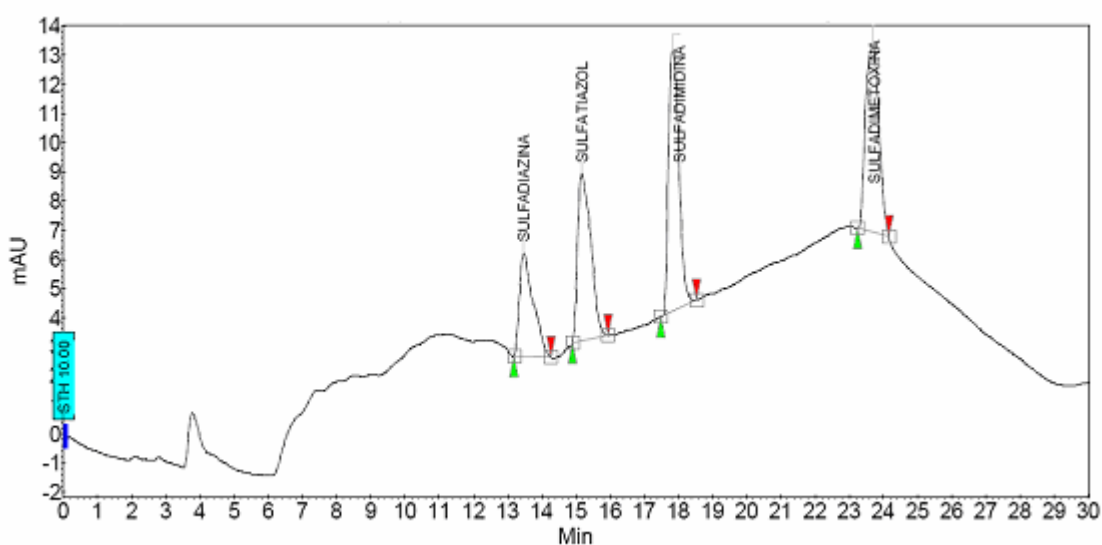


Figura 20 - Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5.

Outro teste realizado foi a otimização do tempo de análise. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação e a resolução dos picos, o fluxo da fase móvel foi variado de $0,4$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados demonstraram que quanto menor o fluxo da fase móvel sulfadiazina e sulfathiazol apresentam tempos de retenção bem próximos dificultando a

separação dos picos. Em fluxos maiores ocorre uma melhor separação. O fluxo de 1 mL min⁻¹, apresentou os melhores resultados podendo-se observar separação dos picos satisfatória.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Depois de selecionadas as condições cromatográficas foram realizados cinco repetições em concentração 1,0 mg L⁻¹ para cada sulfonamida, com os melhores resultados dos testes anteriores. Na Tabela 8 são listadas as condições cromatográficas selecionadas. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 8 - Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.

Item	Condições
Equipamento	CLAE-DAD
Coluna	CL-18, 150mm x 4,6mm, 4µm - Phenomenex
Coluna de Guarda	KJO-4282 – Phenomenex
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Água
Proporção dos solventes	10:90
(A:B)	15:85
	30:70
	40:60
	15:85
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	278 nm

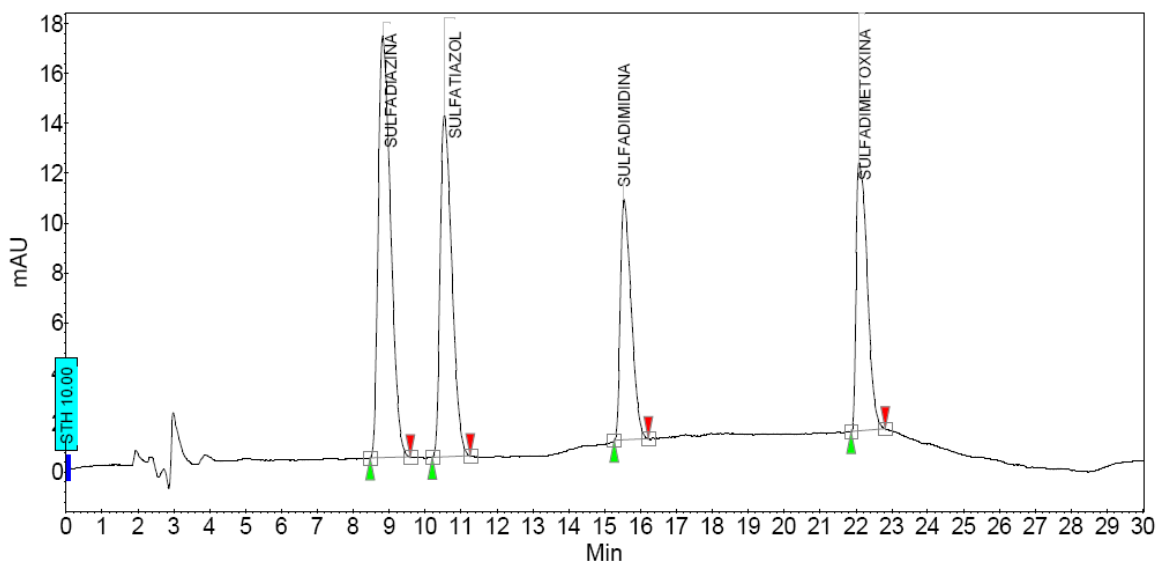


Figura 21 - Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

A estabilidade dos padrões também foi avaliada nesta etapa. A avaliação da estabilidade das soluções intermediárias utilizadas na metodologia analítica foi realizada com o objetivo de verificar a ocorrência de degradação do analito. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos padrões durante a estocagem a -10°C em um período de 3 meses. As amostras foram analisadas após 1 semana, 1, 2 e 3 meses. Definiu-se como critério de aceitação variações menores que 20% em relação à concentração inicial, levando-se em consideração possíveis alterações ocasionadas pelo próprio armazenamento.

Verificou-se que a estabilidade dos padrões é mantida por até 3 meses e 7 dias, após esse período a concentração dos padrões sofre uma perda média do analito de aproximadamente 40 %. A Figura 22 apresenta um gráfico com a percentagem de degradação das soluções-padrão.

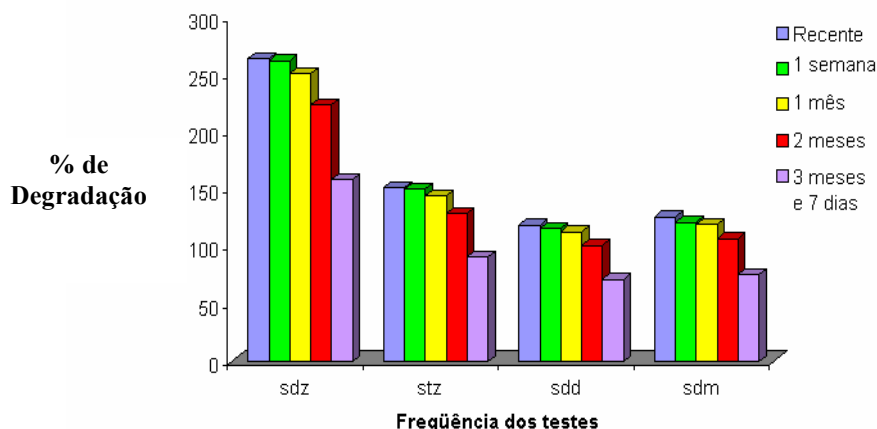


Figura 22- Estudo da degradação das soluções-padrão

6.5 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS

A metodologia de extração utilizada neste trabalho baseou-se em estudos de; SUN *et al.* [9]; BISWAS *et al.* [71]; WANG *et al.* [67]; ZOTOU e VASILADOU [11]; MAUDENS, ZHANG E LAMBERT [63]; PECORELLI *et al.* [18]; MARTEL e ZEGANNE [64]; PANG *et al.* [65]; CANCHO-GRANDE *et al.* [116]; FURUSAWA [14]; STOEV & MICHAILOVA [80]; VIÑAZ *et al.* [86]; HORIE *et al.* [66].

Os testes foram realizados utilizando-se extrato de mel, preparado pela diluição de 1,0 g de mel em água + solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (amostra sem hidrólise ácida) e extrato hidrolisado de mel (1,0 g de mel + solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}). Foram utilizados volumes de 100,0 mL de amostras fortificadas com as sulfonamidas de interesse. Para os testes preliminares utilizou-se nível de fortificação de 50 ng g^{-1} de cada sulfonamida. A extração foi realizada em triplicata e as injeções cromatográficas também foram feitas em triplicata. Avaliou-se a recuperação de cada composto após os procedimentos de extração, comparando-se com a injeção, direta dos padrões das sulfonamidas. Uma vez estabelecidas as condições, novos testes foram realizados, utilizando-se três níveis de fortificação (25 , 50 e 100 ng g^{-1}).

6.5.1 Pré-tratamento da amostra

Em síntese, podemos definir o mel como um produto açucarado, constituído em sua maioria por açúcares. As sulfonamidas têm como característica formarem ligações com açúcares, principalmente ligações com açúcares redutores, podendo formar uma variedade de diferentes compostos açúcar-sulfonamida [114] o que poderia modificar o comportamento dos picos cromatográficos pelo efeito de matriz. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre açúcar e sulfonamida, estudada por Sheth *et al.* [114]. No citado estudo, realizou-se uma reação de uma molécula de sulfatiazol com uma molécula de açúcar redutor, ocorrendo a formação de uma base de Schiff (n-glucosilamina) e liberação de uma molécula de água, formando-se em seguida um composto de Amadori e, após um longo período de armazenamento, o autor comenta a possibilidade de formação de outros produtos da reação de Maillard. O referido autor cita também que sobre condições ácidas a tendência é a formação de sulfonamidas livres devido a ionização do grupo amina. O autor ainda afirma que a ligação de açúcares-sulfatiazol poderá ocorrer com outras sulfonamidas também.

Schwaiger e Schuch [115] estudaram e provaram que para a determinação de sulfonamidas em mel é necessário uma etapa de hidrólise ácida antes da análise cromatográfica para quebrar as ligações açúcar-sulfonamida. Observaram também que após a hidrólise ácida é necessário realizar um ajuste no pH do meio para 4,5 para que as sulfonamidas permaneçam estáveis no meio.

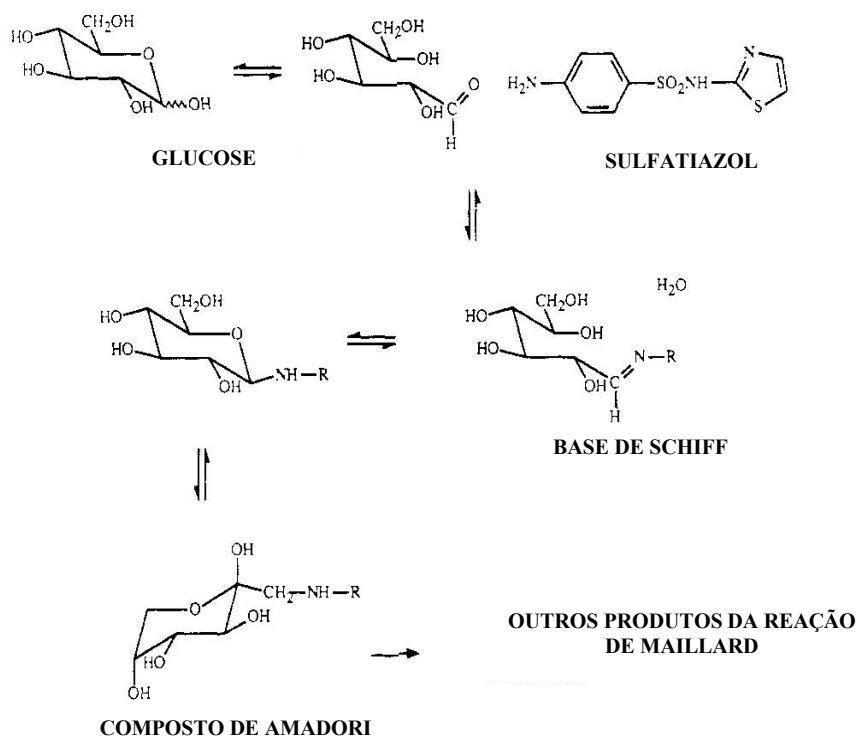


Figura 23 – Esquema da reação açúcar-sulfonamida.
 Fonte: adaptado de [114].

Inicialmente foram realizados testes para selecionar as melhores condições para o pré-tratamento da amostra. Na Tabela 9 são apresentados os testes realizados.

Tabela 9 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

Após definidas as condições para a hidrólise foram realizados dois testes com a matriz. O primeiro consistiu somente na diluição de 1,0 g de mel em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5, neste caso não utilizou-se hidrólise ácida. O segundo teste consistiu na realização de uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico, como descrito na seção 5.3.2.1. Os resultados dos testes de hidrólise mostraram que as variáveis que mais influenciam na eficiência da hidrólise ácida são concentração e volume de ácido adicionado e tempo de agitação. A forma de agitação influencia, mas não como as outras variáveis. A concentração do ácido mostrou ser uma variável muito importante, sendo a concentração de 2M a mais eficiente. O volume de ácido adicionado influencia tanto na dissolução quanto na eficiência da hidrólise. O tempo de agitação também está diretamente ligado à eficiência da hidrólise. O conjunto de condições: concentração de 2M e tempo de 30 minutos, apresentou bons resultados, mas não melhores dos que os apresentados na mesma concentração e tempo de 45 minutos.

Das condições estudadas, os melhores resultados foram os obtidos pelo seguinte conjunto: concentração de 2M, 2 mL de ácido e 45 min. O volume de 2 mL propiciou melhores resultados, no entanto, dificulta a dissolução do mel, tendo-se optado pela adição de volume de 5 mL. A agitação em banho ultra-som foi escolhida por apresentar resultados um pouco melhores do que os encontrados com o uso da mesa agitadora. Nas Figuras 24 - a e b, são apresentados os cromatogramas correspondentes a este teste. Pode-se observar através das Figuras que sem hidrólise do mel ocorreram muitos ruídos, porém a evidência mais importante é que não foram observados os picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas de interesse. Na amostra testemunha fortificada foram observados vários picos interferentes em tempos de retenção próximos aos dos picos das sulfonamidas de interesse. A

ocorrência destes picos cromatográficos pode ocasionar diminuição nas áreas dos picos cromatográficos das sulfonamidas de interesse o que pode levar a resultados errados. Na Figura 24 b é apresentado um cromatograma típico de uma amostra de testemunha fortificada sem passar por uma etapa de hidrólise ácida.

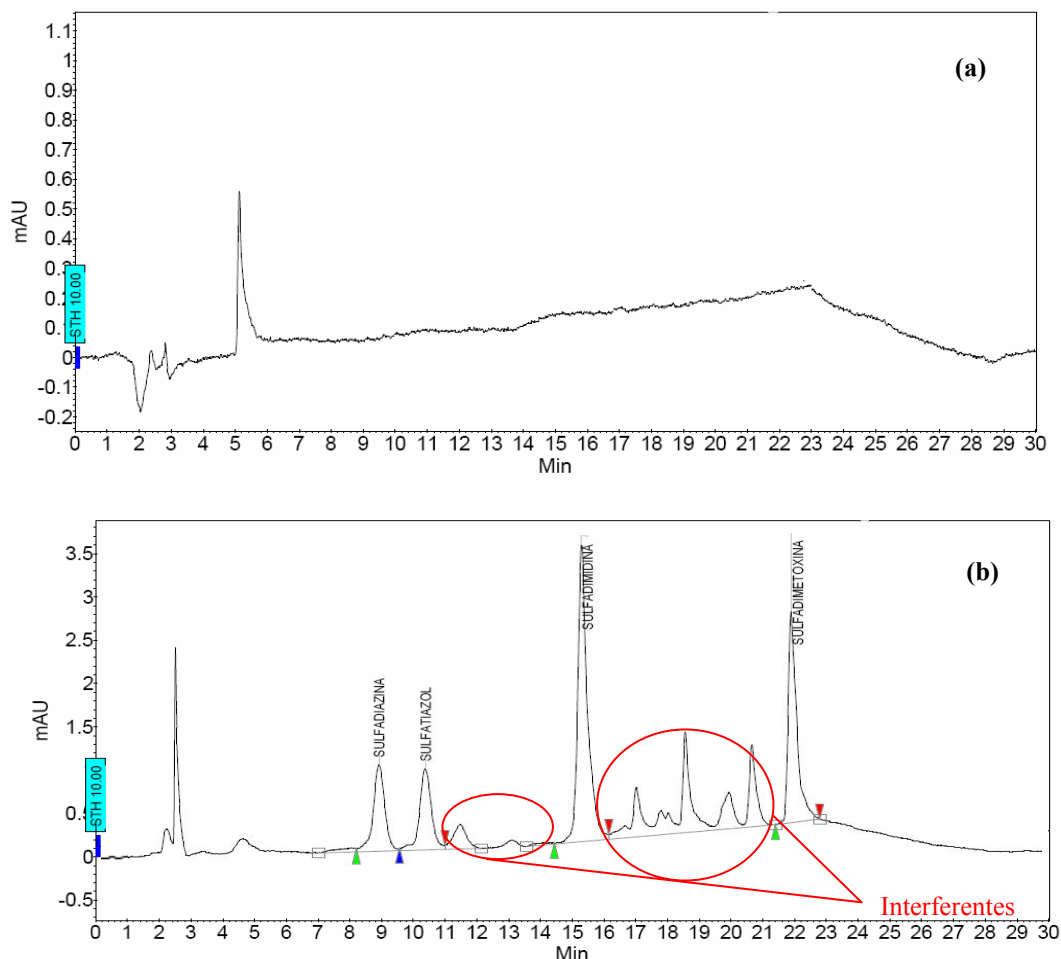


Figura 24 - Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹, sem hidrólise ácida.

De um modo geral, todos os testes de hidrólise mostraram-se etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. Para o mel submetido à etapa de hidrólise ácida, foi possível perceber melhora do ruído no cromatograma, não sendo também observados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Os melhores resultados são mostrados nas Figuras 25 - a e b.

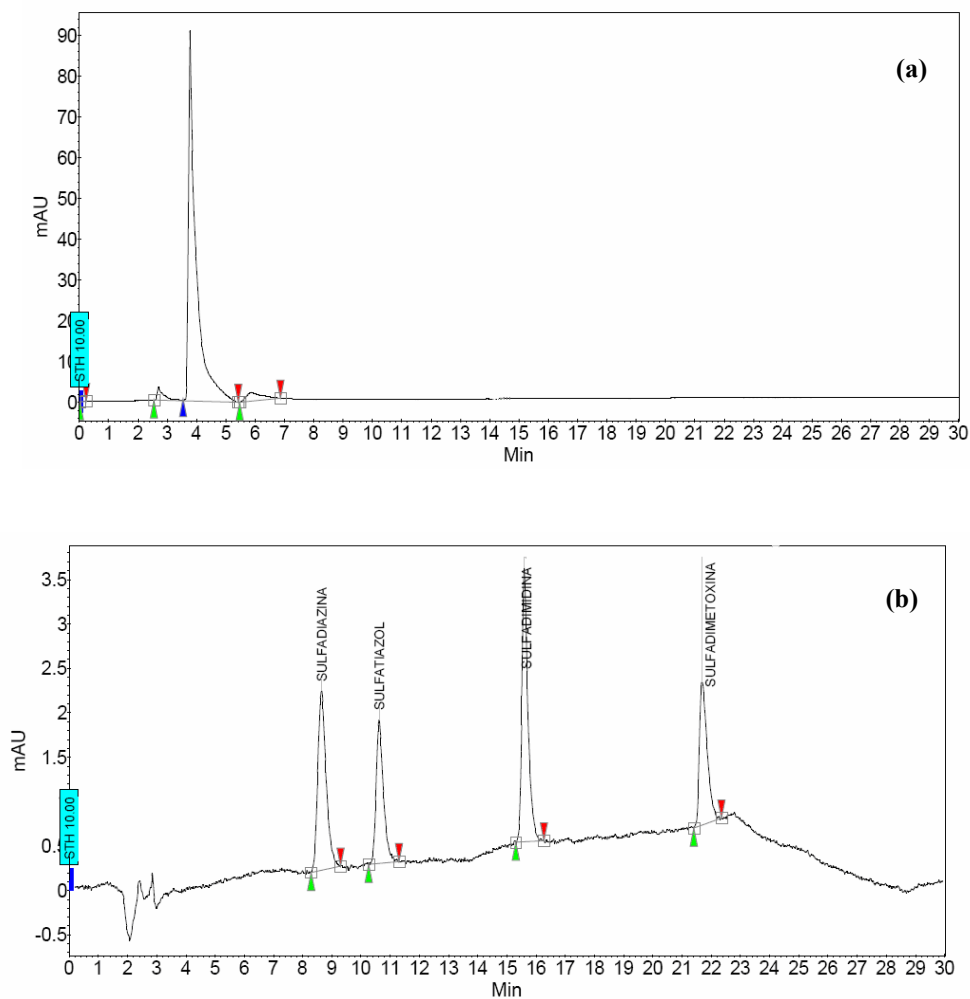


Figura 25 - Cromatogramas obtidos nos testes de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , com hidrólise ácida.

Pode-se evidenciar por este estudo a importância da etapa de hidrólise ácida, observando-se no cromatograma sem hidrólise a presença de vários picos interferentes próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, o que levou a uma redução das áreas dos picos dos compostos. Com a amostra de mel submetida à hidrólise ácida o cromatograma quase não evidenciou interferentes, tendo apresentado separação adequada dos picos das sulfonamidas.

6.5.2 Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração por fase sólida

Os testes realizados para escolha do adsorvente, solvente para condicionamento do cartucho e solvente para eluição tiveram por objetivo escolher o conjunto de condições que oferecessem a melhor eficiência na extração, ou seja, os melhores resultados de recuperação. As recuperações obtidas na extração de compostos nos níveis de concentração estudados deve ser entre 70-120%. As fases e condições utilizadas nas extrações são citadas na Tabela 10.

Cabe mencionar, que a eficiência da extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na amostra de mel fortificada em relação ao analito em solução padrão.

Tabela 10 - Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)

Teste	Cartucho	Condicionamento
Teste 1	C-8	MA/MAT/AA/AAT*
Teste 2	C-18	MA/MAT/AA/AAT
Teste 3	Nexus	MA/MAT/AA/AAT

***MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.**

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos testes de eficiência de extração. Quando metanol foi utilizado como solvente de eluição recuperações inferiores a 70% foram obtidas.

Tabela 11 - Resultados dos testes de eficiência de extração

Analito	Eluente	Eficiência da extração (% de recuperação)											
		C8 (teste 1)				C18 (teste 2)				Nexus (teste 3)			
		MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT
SDZ	MeOH	42	41	49	48	53	64	56	60	57	60	62	65
	ACN	61	67	65	70	66	70	68	73	73	79	80	84
	Tampão	58	62	61	62	67	73	70	76	73	77	79	83
STZ	MeOH	39	45	40	48	55	51	51	56	51	58	56	59
	ACN	56	60	55	65	62	64	63	71	60	67	75	84
	Tampão	51	60	55	60	55	63	66	70	62	66	68	76
SDD	MeOH	42	45	44	47	55	61	64	63	53	60	53	63
	ACN	60	65	62	66	63	68	67	66	72	76	74	79
	Tampão	62	64	63	57	66	72	74	68	64	69	70	78
SDM	MeOH	43	47	42	45	51	59	54	61	55	58	52	61
	ACN	60	63	62	67	70	64	67	63	73	76	66	79
	Tampão	55	58	56	58	72	75	74	78	71	74	78	82

Analisando-se os resultados da Tabela 11, observa-se que os cartuchos Nexus proporcionaram recuperações, de 51 a 65%, em todos os tipos de condicionamento realizados. Para os cartuchos C18, as recuperações variaram entre 51-64%. Com cartucho C8 menores recuperações foram obtidas de 41-49%, supondo-se problemas com a polaridade da fase.

Dos condicionamentos testados, os solventes acetonitrila/água/tampão foram os que apresentaram melhores resultados para todos os cartuchos. A utilização de tampão no condicionamento proporcionou melhores resultados. Os solventes metanol/água foram a sequência que apresentaram menores valores de recuperação.

Para a eluição, verificou-se que, com acetonitrila, as recuperações foram melhores dos que as obtidas quando metanol foi utilizado como solvente de eluição dos analitos. As recuperações encontradas foram de 51-84%. Analisando-se os resultados dos testes utilizando-se acetonitrila como eluente, observou-se que com cartuchos Nexus, melhores recuperações foram também obtidas (60-84%). O cartucho C18 também apresentou resultados satisfatórios (62 a 73%). Para o cartucho C8, menores recuperações (55-70%) foram obtidas.

As extrações utilizando tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹), pH 4,5 e adição de 1% de metanol como eluente para os analitos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com acetonitrila. As recuperações para os cartuchos Nexus foram de 62-83%. Já

para o cartucho C18 foram de 55-79% e para o cartucho C8 as recuperações foram de 51-62%.

Com base nos resultados encontrados, quanto ao material que constitui a fase sólida do cartucho, pode-se observar que o cartucho Nexus apresentou uma maior interação com as moléculas dos analitos dos que as fases sólidas C8 e C18 obtendo-se melhores resultados em todos os testes. Os resultados dos testes realizados com os cartuchos C8 não foram satisfatórios para nenhuma das condições testadas. Pressupõe-se que a polaridade da fase possa ter interferido na extração. E como eluente a acetonitrila apresentou os melhores resultados, incluindo secagem mais rápida sob fluxo suave de nitrogênio.

Objetivando-se promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes também foram realizados dois testes de *clean-up*, ambos utilizando-se cartuchos de *Florisil*, 500 mg/6mL. O primeiro teste (*clean-up* 1) foi realizado com 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila e o segundo teste (*clean-up* 2) foi realizado com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após a passagem das amostras pelos cartuchos de *Florisil*, submeteu-se a fluxo suave de nitrogênio até a secura. As amostras foram retomadas com 1 mL de acetonitrila e injetadas. A Figura 26 apresenta os resultados dos testes de % de recuperação das quatro sulfonamidas estudadas com as duas condições de *clean-up* testadas.

Dentre os procedimentos empregados, o que demonstrou maior recuperação do analito foi o que empregou 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila. No entanto, estes resultados não foram melhores do que os obtidos quando não realizado procedimento de *clean up* com cartuchos de *Florisil*, optando-se, portanto pela não utilização deste passo nas demais análises para a determinação de sulfonamidas em mel.

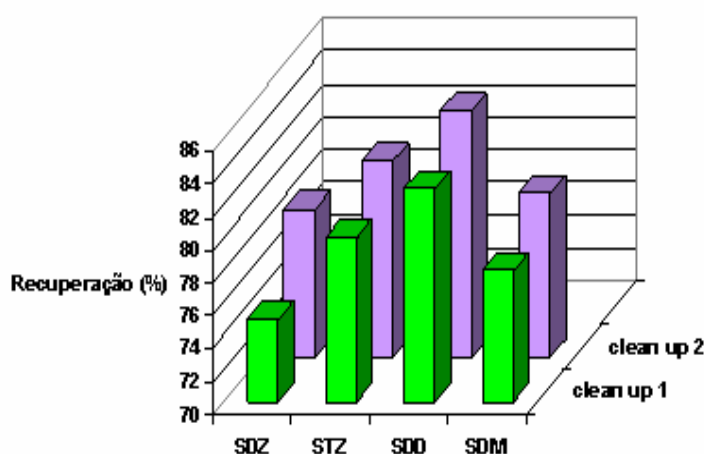


Figura 26 - Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de *clean-up*.

Depois de selecionadas todas as condições de extração, foram realizados novos experimentos de extração, em triplicata, em três níveis de concentração: 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para otimizar as condições de extração do método desenvolvido. Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração selecionadas.

Tabela 12 – Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.

Composto	Concentração		
	25 ng/g	50 ng/g	100 ng/g
SDZ			
Rec±RSD, (%)	80 ± 12,50	83 ± 8,43	85 ± 5,88
STZ			
Rec±RSD, (%)	71 ± 15,49	76 ± 11,84	80 ± 7,50
SDD			
Rec±RSD, (%)	77 ± 12,99	81 ± 9,88	83 ± 6,02
SDM			
Rec±RSD, (%)	75 ± 13,33	79 ± 10,13	81 ± 6,17

*n=3

Na Figura 27 é apresentado o cromatograma no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹ obtido após estabelecimento das condições de extração.

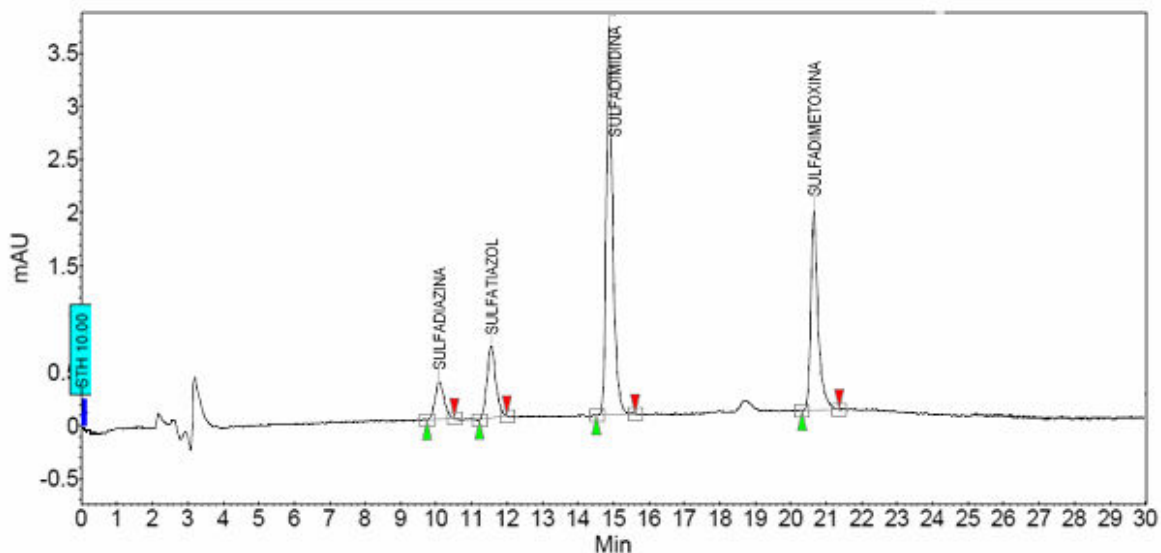


Figura 27 - Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas e otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica, como no preparo da amostra para a determinação das sulfonamidas por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de sulfonamidas no mel. Antes da validação, verificou-se a conformidade do sistema seguindo as recomendações da *Food and Drug Administration* – FDA, 2004.

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

6.6.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros da conformidade do sistema avaliados: número de pratos (N), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As), estão de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas vigentes e foram obtidos satisfatoriamente. Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos dos parâmetros para verificação da conformidade do sistema cromatográfico.

Tabela 13 - Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico

Sulfonamidas	t _R	N	k	Rs ^(*)	As
SDZ	8,45	8002,23	1,6	3,0	1,04
STZ	10,33	8710,16	2,8	6,74	1,25
SMZ	15,24	12014,63	3,4	8,44	1,20
SDM	22,09	26853,47	4,0	11,41	1,00

t_R – tempo de retenção das sulfonamidas; N – número de pratos teóricos; k – fator de retenção; Rs – resolução; As – fator de assimetria

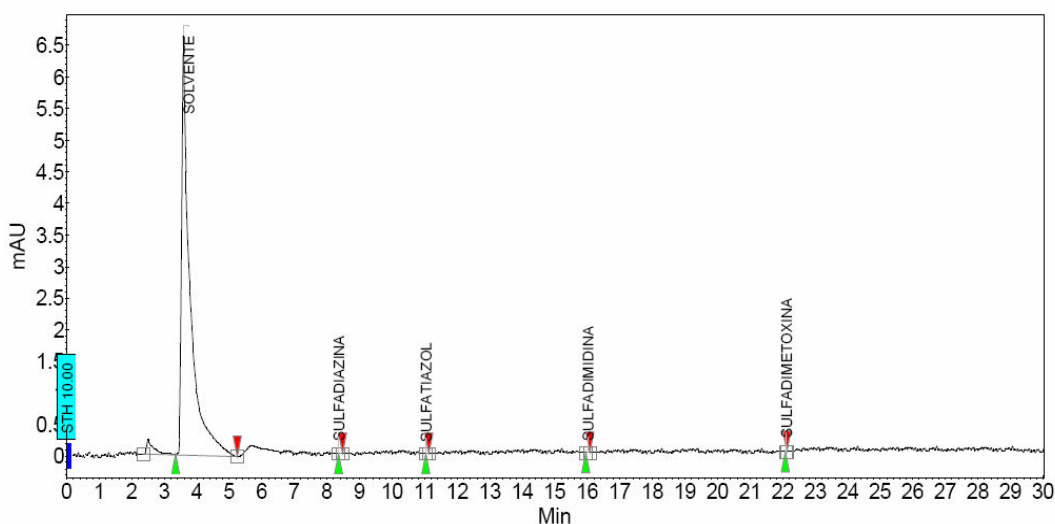
(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes.

Considerando-se as condições citadas por SHABIR [113]: $1 \leq k \leq 10$; $Rs > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

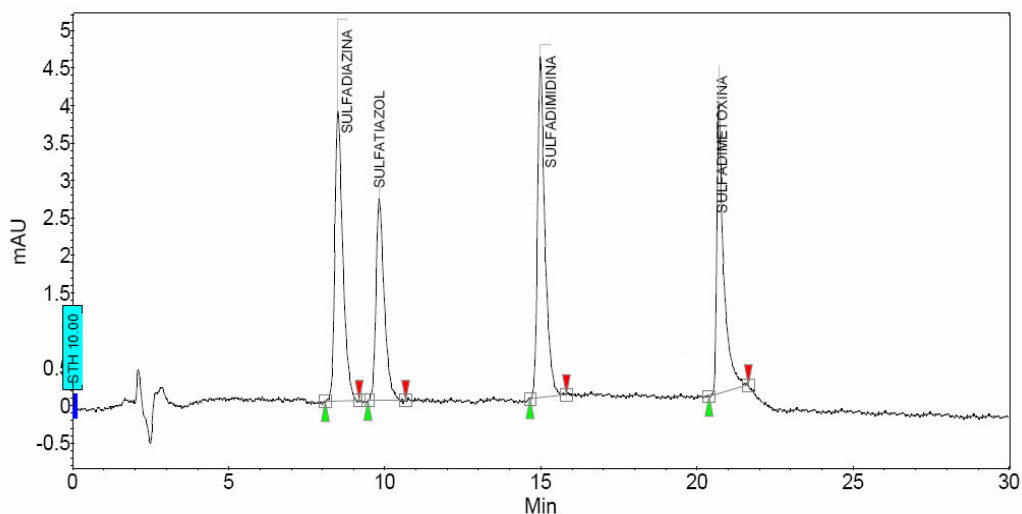
6.6.2 Seletividade

O estudo da seletividade do método teve como objetivo quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no mel. A seletividade foi testada analisando-se o extrato da amostra testemunha (extrato contendo só mel) e o extrato da amostra testemunha fortificado com as sulfonamidas (extrato contendo mel fortificado com as sulfonamidas).

No extrato da amostra testemunha não foram observados picos interferentes referentes aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, durante toda a separação cromatográfica. Foram observados apenas sinais característicos do solvente. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28 - a e b.



(a)



(b)

Figura 28 - Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.

Segundo a ANVISA não são recomendados que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito sejam superiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Como verificado na Figura 31, não existem picos interferentes, conclui-se, portanto, que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

6.6.3 Curva analítica

Foram construídas curvas analíticas, com soluções-padrão. As curvas analíticas com os padrões foram feitas com cinco injeções sucessivas (em quintuplicata), de cada ponto das curvas (25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$), sempre da menor para a maior concentração, sendo utilizada a média das leituras para a construção das curvas.

As curvas foram construídas plotando-se a área do pico *versus* a concentração do analito (Figura 29), onde y é a resposta em unidades de área e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

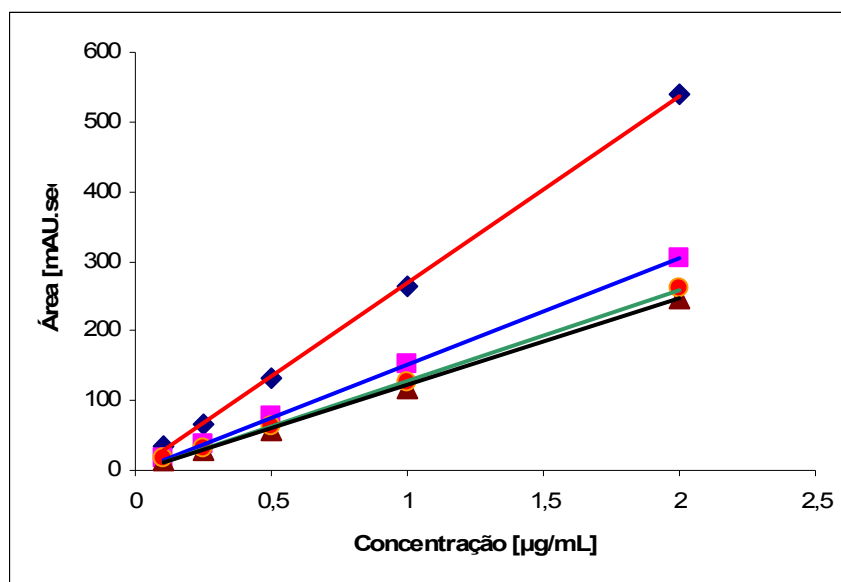


Figura 29 – Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).

Os valores das leituras foram submetidos a tratamentos estatísticos para obtenção dos coeficientes de correlação (r^2) e as equações das retas de cada sulfonamida pela extrapolação dos dados com o uso do *software Origin 6.0* e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão

Sulfa	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação de regressão	Coefficiente de correlação (r^2)
SDZ	0,025-2,0	$3,5754x - 0,021$	0.9990
STZ	0,025-2,0	$2,9936x - 0,043$	0.9996
SDD	0,025-2,0	$2,3462x - 0,019$	0.9994
SDM	0,025-2,0	$2,2321x - 0,063$	0.9983

Os coeficientes de correlação encontrados, todos superiores a 0,9900, demonstraram que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração estudado. Os resultados encontrados estão de acordo com as recomendações da ANVISA [58] para a validação de métodos analíticos.

6.6.4 Faixa linear, linearidade, sensibilidade

Para todo método existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,9900. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

A linearidade da resposta foi determinada através da habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear.

A sensibilidade foi estudada como a resposta do detector em função da concentração do analito, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

6.6.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das soluções-padrão das sulfonamidas em concentração decrescentes. Os limites de

detecção e quantificação foram calculados através das relações sinal/ruído. Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação.

6.6.6 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g⁻¹). O nível de fortificação utilizado nesta pesquisa baseou-se no LMR estabelecido pelo PNCR, do MAPA.

Tabela 15 - Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SDM
Faixa linear (µg mL ⁻¹)	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0
Sensibilidade (µau mL µg ⁻¹)	-0,021	- 0,043	-0,019	-0,063
Linearidade (r ²)	0.9990	0.9996	0.9994	0.9983
Precisão intra-ensaio (%RSD) n=5	2,84	5,24	4,31	3,01
Precisão inter-ensaio (%RSD) n=5				
25 ng g ⁻¹	12,99	11,11	12,65	10,81
50 ng g ⁻¹	5,81	8,64	7,14	6,02
100 ng g ⁻¹	3,41	4,88	3,49	3,57
LD (ng mL ⁻¹)	20	25	30	30
LQ (ng mL ⁻¹)	66	75	90	90

6.6.6.1 Precisão

Segundo o INMETRO [95] a precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Nesta pesquisa a precisão intra-ensaio foi avaliada mediante a análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, de duas amostras de mel fortificadas até a concentração de 100 ng g^{-1} . O RSD para todas as sulfonamidas ficou na faixa de 2,84 a 5,81% (Tabela 15). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de mel fortificadas em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}) em três dias diferentes, em quintuplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todas as sulfonamidas foi na faixa de 3,41 a 12,99% (Tabela 15).

Para a ANVISA [58] os intervalos de desvio padrão relativo (RSD) são considerados adequados se valores até 20% forem encontrados. Como todos os valores de RSD mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto pode ser considerado preciso.

6.6.6.2 Exatidão

A exatidão é medida com relação ao quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra [104], representado pelos valores das recuperações.

Foram realizados dois testes de recuperação, um utilizando apenas um nível de fortificação (100 ng g^{-1}) e um outro utilizando três níveis de fortificação (25, 50 e 100 ng g^{-1}). Para os testes de recuperação realizados em um mesmo dia, mesmo equipamento e mesmo analista, as recuperações variaram na faixa de 83 a 89,3%, estes resultados se encontram de acordo com os valores estipulados pela ANVISA [58], confirmando a exatidão do método.

As recuperações médias das sulfonamidas nos três níveis de fortificação avaliados de 74 a 88 %. Os menores valores de recuperação foram obtidos para o menor nível de fortificação, 25 ng g^{-1} , sendo de 72% e, proporcionalmente, a melhor recuperação foi encontrada para o maior nível de fortificação, 100 ng g^{-1} (88%). Dentre as quatro sulfonamidas estudadas, a sulfadiazina foi a que apresentou os melhores resultados em todos os níveis de fortificação (77, 86 e 88%, respectivamente).

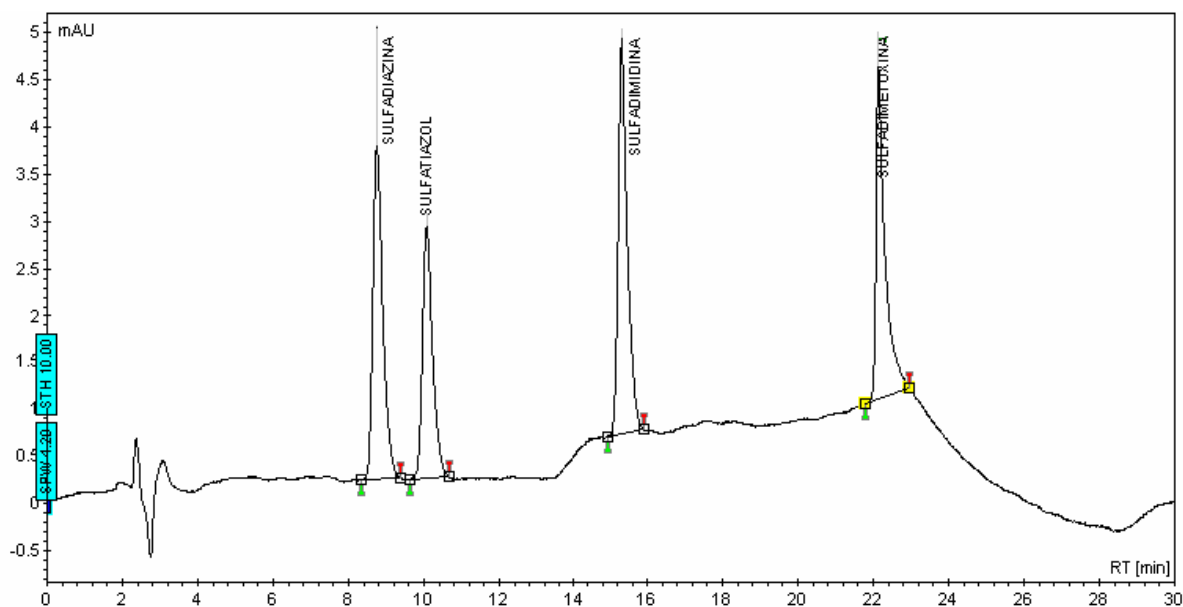


Figura 30 - Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹.

Os valores das recuperações das sulfonamidas obtidos nos três níveis ensaiados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.

Sulfa	Nível (ng g ⁻¹)	RM (%)	t _{calc}
SDZ	25	77	-1,05
	50	86	-1,40
	100	88	-2,00
STZ	25	72	-1,64
	50	81	-1,05
	100	82	-2,25
SDD	25	79	-1,05
	50	84	-1,14
	100	86	-2,33
SDM	25	74	-1,62
	50	82	-1,80
	100	84	-2,67

RM (%)= média das recuperações; t_{calc}= teste “t” de *Student* calculado

6.6.6.3 Avaliação estatística do método

Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student de significância. Na Tabela 16 são apresentados os resultados com as médias das recuperações percentuais relativas (RM%) obtidas para 5 (n-1) repetições e o t calculado para 95% do intervalo de confiança ($t_{95\%}$) do método aplicado.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados menores que o valor tabelado, $t_{tab}=2,78$, (Quadro 02 – ANEXO 2). Deste modo, aparentemente não existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), podendo-se considerar o método exato.

6.7 ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

O método proposto após ser desenvolvido e validado, foi utilizado para estimar a concentração das quatro sulfonamidas de interesse nesta pesquisa em amostras comerciais de mel provenientes do Estado do Maranhão e de estados vizinhos como o Piauí e Tocantins. Todas as amostras foram coletas no período de setembro de 2007 a março de 2008. Na Tabela 17 são apresentados o número de amostras, as cidades de coleta e suas respectivas codificações.

O objetivo destas análises foi aplicar o método desenvolvido, não realizando, portanto, um controle de qualidade mais completo nas amostras utilizadas, para o qual seriam necessárias mais amostras e aplicação de procedimentos de amostragem e coleta específicos para tal fim.

Tabela 17 – Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.

Estado	Cidade	Nº de amostras	Código
Maranhão	São Luís	01	MA1
	Santa Luzia do Paruá	01	MA2
Piauí	Teresina	01	PI
Tocantins	Paraíso	01	TO1
	Barrolândia	01	TO2

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da aplicação do método nas amostras de comerciais de mel.

Tabela 18 – Análise das amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.

Composto	Quantidade média (ng g ⁻¹) em amostras de mel, n=3				
	MA1	MA2	PI	TO1	TO2
SDZ	nd*	nd	nd	nd	nd
STZ	nd	nd	nd	nd	nd
SDD	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado, aplicando o LD de 20 ng g⁻¹ e LMR de 100 ng g⁻¹.

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os cromatogramas das amostras de méis de Santa Luzia do Paruá, São Luís, Tocantins e Piauí analisadas utilizando-se o método proposto.

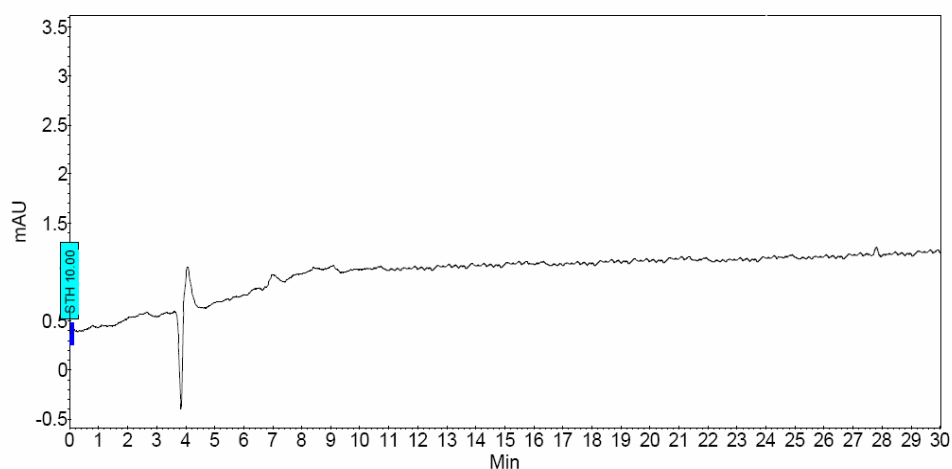


Figura 31 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá.

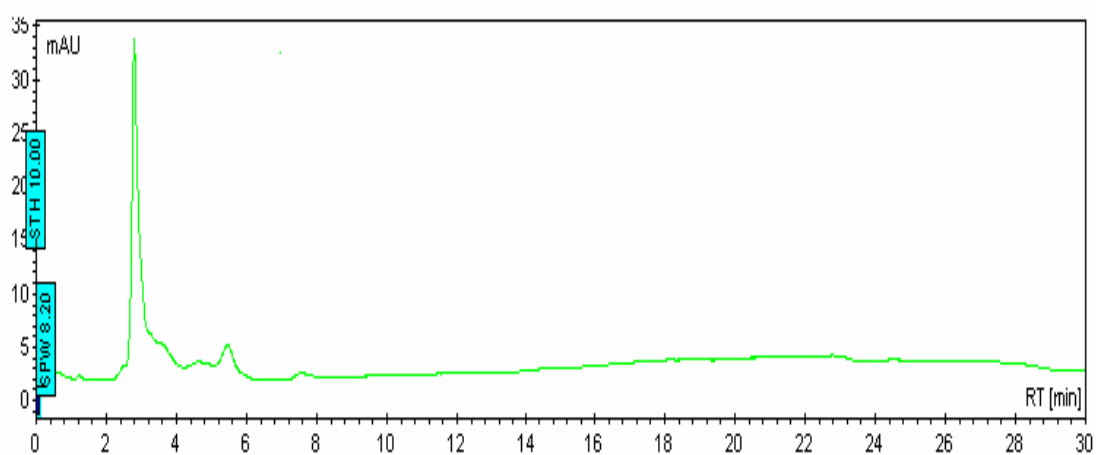


Figura 32 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.

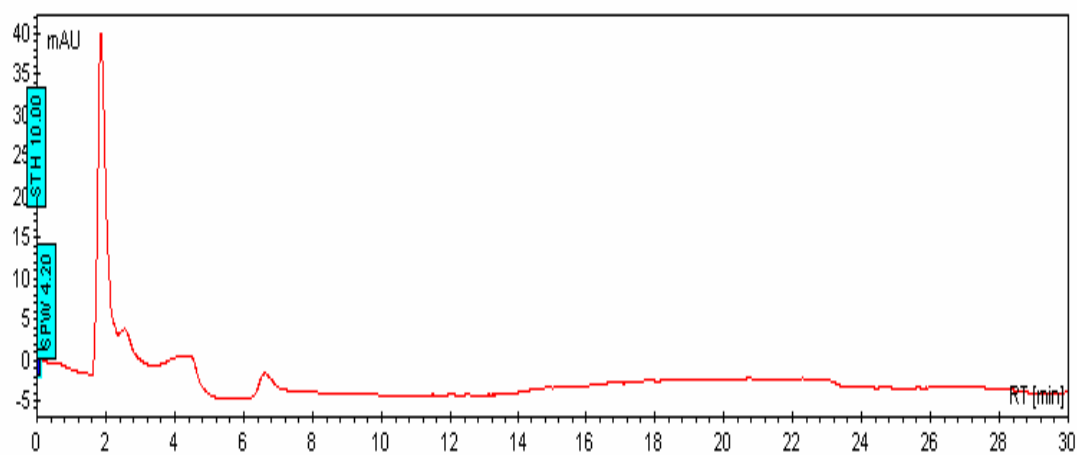


Figura 33 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins

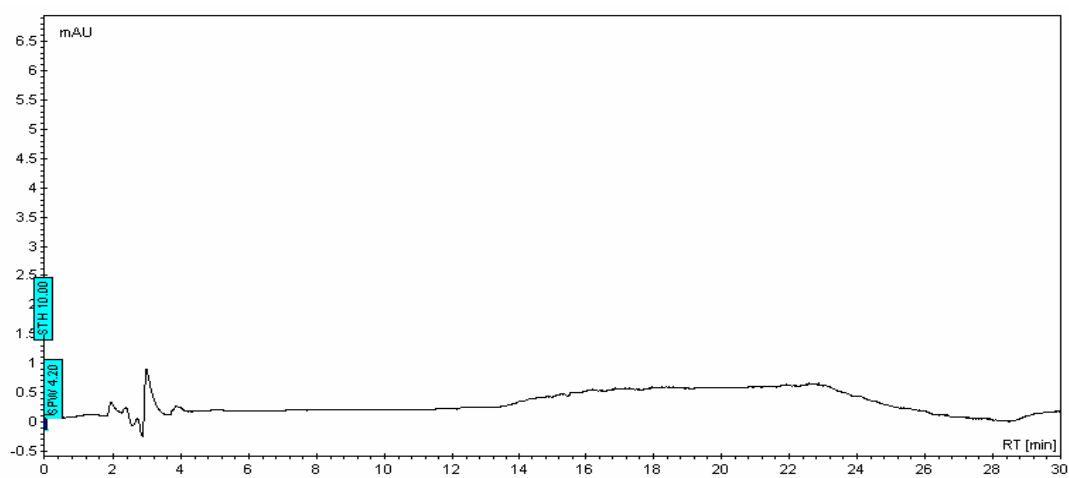


Figura 34 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí

Verifica-se pelas Figuras 31, 32, 33 e 34 que não há presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, indicando que as amostras estão livres de contaminação por resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina. Também não foram verificados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas nas outras amostras comerciais de mel estudadas.

7. CONCLUSÕES



7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel. O procedimento proposto foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato nas condições estabelecidas. Considerando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sulfonamidas ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), os limites de detecção e quantificação do CLAE-DAD apresentaram-se adequados para a análise de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel foi o preparo da amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realizou a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes.

A parte do trabalho relacionada aos estudos de pré-tratamento da amostra, ou seja, a etapa de hidrólise ácida mostrou-se eficiente para a redução do número de interferentes.

Os estudos de recuperação mostraram que para a extração de sulfonamidas em mel os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos Nexus. Foram realizados testes de recuperações em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}). As recuperações médias obtidas após otimização do método variaram de 72 a 88%, e os coeficientes de variação variaram de 2,84 a 12,99%.

Foi verificado que as amostras de mel coletadas e analisadas não apresentaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina, fato este que serve como indício da qualidade do mel produzido na Região Norte e Nordeste.

8. REFERÊNCIAS



8. REFERÊNCIAS

- [1] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000.
- [3] SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia – Relatório Completo**. Série Mercado. 2006.
- [4] PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. **Mel: Câmbio e Embargo Europeu podem prejudicar exportações em 2006**. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.4. abril/2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>> Acesso em: 19 de março de 2007.
- [5] SHIMANUKI, H. Bacteria. In: Flottum, K. (Ed.), **Honey Bee Pests, Predators, and Disease**, third ed. pp. 33–54, Medina, Ohio. 1997.
- [6] SCHWARTZ, D.P.; SHERMA, J.. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.72, 1986.
- [7] SHERMA, J.; BRETSCHNEIDER, W.; DITTAMO, M.; DIBIASE, N.; HUH, D.; SCWARTZ, J.P. **Journal of Chromatography**. v.463, p.229, 1989.
- [8] NEIDERT, E; BARANIAK, Z.; SAUVE, A. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.641, 1986.
- [9] SUN, H.; AI, L.; WANG, F. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. **Chromatographia**, v.66, N. 5/6, p.333-337, setembro, 2007.
- [10] FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M. de S.; SANTOS, J.G.R. dos; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTANA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.80-82, 2007.

- [11] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p.307-311, 2006.
- [12] GALLINA, A.; BENETTI, C.; BIANCOTTO, G.; BAGGIO, A.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; MUTINELLI, F. Antibiotics residues in honey: validation procedure. **APIACTA**, V.40, P.45-49, 2005.
- [13] ZAYAS-BLANCO, F. de; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatography separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, p.375-378, 2004.
- [14] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.
- [15] AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 3531-3539, 1990.
- [16] SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 875-879, 1990.
- [17] GARCÍA, J.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; ALDAMA, J.M. Validation of an analytical method to determine sulfamides in kidney by HPLC-DAD and PARAFAC 2 with first-order derivate chromatograms. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p. 222-234, 2007.
- [18] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European UNION REGULATION 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.23-29, 2004.
- [19] KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxyl/ N^4 -acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues and eggs. **Talanta**, v.67, p.54-58, 2005.

- [20] QUINTANA-RIZZO, J.; SALTER, R.S.; SAUL, S.J. Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin honey. **APIACTA**, V.40, P.55-62, 2005.
- [21] FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. **Chromatographia**, v.57, N. 5/6, p.317-320, 2003.
- [22] HAMMEL, Y.A; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.H.; GUY, P.A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p.58-76, 2008.
- [23] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.
- [24] MOHAMED, R.; HAMMEL, Y.-A.; LeBRETON, M.-H; TABET, J.-C.; JULLIEN, L.; GUY, P.A. Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1160, p.194-205, 2007.
- [25] LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.72, p.1082-1087, 2007.
- [26] KISHIDA, K. Quantitation and confirmatory of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, v.18, p.301-305, 2007.
- [27] BATT, A.L.; SNOW, D.D.; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, p.1963-1971, 2006.

- [28] PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, p.225-232, 2006.
- [29] KERR, W. E. **Papel das abelhas sociais na Amazônia**. Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente. (Florianópolis – SC - Brasil). 119-129. 1979.
- [30] SEBRAE, Apicultura brasileira – Produção Nacional. Disponível em : <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/IBGE.pdf> Acesso: 07 fev. 2008.
- [31] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2003 – 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1 Acesso em 23 ago, 2007.
- [32] SODRÉ, G. da S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA - APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [33] CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985, 226p.
- [34] NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [35] NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/storyhoney.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [36] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.
- [37] CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura - 01).
- [38] HOOPER, T. Guia do apicultor. [S.1]: Publicações Europ-América, p. 223-266, 1976.

- [39] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [40] SHIMANUKI, H., KNOX, D.A. Susceptibility of *Bacillus* larvae to Terramycin. **American Bee Journal**. 134, 125–126. 1994.
- [41] HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., KERSTERS, K., DEVOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N., AND BERKELEY, R. C. W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ahs *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.46, 270–279. 1996.
- [42] ALIPPI, A. M., ALBO, G. N., LENIZ, D., RIVERA, I., ZANELLI, M., AND ROCA, A. E. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control of American foulbrood in honey bees. **J. Apic. Res.** v.38, 149–158. 1999.
- [43] SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**. v.313, 1072–1077. 2006.
- [44] NESTLÉ. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS, Disponível em: www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?download=M3wBPgDB/8ull6Du36WenojQ1NTTjaXZnqWfVpzLhmf> Acesso em: 05 jul. 2007.
- [45] PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- [46] GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.

- [47] FELI, M.A.F. Antibacterianos – Sulfonamidas. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/sulfonamidas2007.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- [48] MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.
- [49] WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 23, n. 4, p.362-384, abril, 2006.
- [50] MERCK, The Merck Index—**An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, Merck, Rahway, NJ, 1989.
- [51] WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.40, ISSUE 7, p. 723-730, abril, 2000.
- [52] MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Campinas-SP, 2007. 197p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. III - Universidade Estadual de Campinas.
- [53] QIANG, Z.; ADAMS, C. Potenciometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**. v.38, ISSUE 7, p.723-730, abril, 2000.
- [54] COMBS, M.T.; KHORASSANI, M.A.; TAYLOR, L.T. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight sulfonamides. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p.301-308, 1999.
- [55] O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 297-319, 1998.

[56] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[57] BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999. Disponível em: <

www.dgv.min-agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório%202006%20divulgação.pdf

> Acesso em: 22 de março de 2007.

[58] ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.

[59] DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. **In: Antimicrobials in foods**. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.

[60] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLMÍ, C.; CURINI, R. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4614-4624, 2004.

[61] MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid-chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85-92, 2004.

[62] MARTEL, A.-C.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, N. 6, p.953-961, 2003.

[63] 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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p.534-541, 2003.

[64] HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, N. 5, p.786-789, 1992.

- [65] WANG, Z.; ZHANG, S.; DING, S.; EREMIN, S.A.; SHEN, J. Simultaneous determination of sulphamethazine and sulphadiazine in a new monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay. **Food Additives e Contaminants**. v.25, p.574-582, maio, 2008.
- [66] TAMOSUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. Comparison of LC and UPLC Coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. **Chromatographia**. v.67, p. 783-788, set, 2008.
- [67] GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A M.M.; RABONE, F.; SALERMO, A.G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 116-119, jan, 2008.
- [68] ZOU, Q.-H; WANG, J.; WANG, X.-F; LIU, Y.; HAN, J.; hou, f.; xie, m.-x. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal AOAC International**, v.91, p.252-257, jan, 2008.
- [69] BISWAS, A.K.; RAO, G.S.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MALIK, J.K. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprin and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8845-8850, 2007.
- [70] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.
- [71] LAMBA, S.; SANGHI, S.K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.110-115, 2005.
- [72] PANG, G.-F.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; JIA, G.-Q; FAN, C.-L.; LI, X.-M.; LIU, Y.-M.; LI, Z.-Y.; SHI, Y.-Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.88, p.1304-1311, maio, 2005.

- [73] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p.259-264, 2005.
- [74] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSA, J.; SNIEGOCKI, T.; GRZEBALSKA, A. Sulfonamides residues in honey. Control and Development of Analytical Procedure. **APIACTA**, v. 38, p.249-256, 2003.
- [75] REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**, V.38, P.23-30, 2003.
- [76] POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p.111-117, 2002.
- [77] HELLER, D.N.; NGOH, M.A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M.H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.39-52, 2002.
- [78] STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamides residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p.37-42, 2000.
- [79] ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 898, p.95-102, 2000.
- [80] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.

- [81] HEERING, W.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAVER, E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v.123, p.2759-2762, 1998.
- [82] GEHRING, T.A; RUSHING, L.G.; CHURCHWELL, M.I.; DOERGE, D.R.; McERLANE, K.M.; THOMPSON JR, H.C. Determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 44, N. 10, 3164-3169, 1996.
- [83] 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, p.1457-1461, outubro, 1996.
- [84] VIÑAZ, P.; ERROZ, C.L.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescent derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.726, 1995.
- [85] PATHY, M. Trace analysis of sulfaquinoxaline in animal tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Vol. 275, 115-125, 1983.
- [86] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation technique for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.36-53, 2007.
- [87] LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, p.1-35, 2004.
- [88] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.68-76, 2001.
- [89] ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos – SP. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2006.

- [90] TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean up procedures and selective detectors. **Journal Chromatography A**, v.823, p.137-146, 1996.
- [91] QUEIROZ, S. C. N.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- [92] MAJORS, R. E. **LC-CG Supplement**. v.8, *maio*, 1998.
- [93] IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba – PR. p.134. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [94] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. **Química Nova**, v.27, n.5, set./out., 2004.
- [95] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ – CGCRE – 008**, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> Acesso em: 24 maio 2007.
- [96] BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.
- [97] RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. Campinas-SP, 96p. Dissertação (mestrado) - Unicamp, 2004.
- [98] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.
- [99] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. London, 1995. Q2A

(CPMP/ICH/381/95). Disponível em: www.eudra.org/emea.html. Acesso em 11 de fev. 2008.

[100] THOMPSON, M.; ELISSON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure App. Chem.**, v.74, p.835-855, 2002.

[101] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals**. Expert Consultation, 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 11 fev. 2008.

[102] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

[103] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

[104] LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76p.

[105] HUBERT, P. et al The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

[106] USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776- 1777, 1995.

[107] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em 26 de out. 2007.

[108] BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

[109] EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods**. Brussels: EUROPEAN COMMISSION, 2004. SANCO/825/00. rev.7. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf>.

Acesso em: 11 fev. 2008.

[110] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora, 2001.

[111] IBGE, Cidades - Prefeituras e Municípios 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>> Acesso em: 23 maio 2008.

[112] GOOGLE EARTH. Disponível em: <www.google.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

[113] SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

[114] SHETH, H.B.; YAYLAYAN, V.A.; LOW, N.H.; STILES, M.E.; SPORNS, P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1125-1130, 1990.

[115] SCHWAIGER, I.; SCHUCH, R. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.** v. 96, p.93, 2000.

[116] CANCHO-GRANDE, B.; FALCÓN, M.S.G.; COMESAÑA, M.R.; GÁNDARA, J.S. Determination of sulfametazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3145-3150, jun. 2001.

[117] INMETRO - INSTITUTO DE QUALIDADE E METROLOGIA. **Expressão da Incerteza de medição**, Rio de Janeiro, Apostila, 2002.

[118] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidande: validation of chromatographic methods**. Rockville: Center for Drug Evaluation

and Research (CDER), 1994. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf. Acesso em 11 de fev. 2008.

[119] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedural Manual**. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

[120] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; SANTOS, T.C.R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p.155-168, 2002.

[121] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, jul./dez., 1994.

[122] DE AMARANTE Jr; O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, São Luís, v.12, n.1/2, p.116-131, 2001.

[123] LEITE, F. In: **Validação em Análise Química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 4ª ed., 2002.

[124] CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.10.

[125] COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp. Campinas, 170 p., 1998.

[126] MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; DIEZ, M.M.; GARCÍA, M.C.M.; GIL, D.B.; CAÑADA-CAÑADA, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in Money simples. **Talanta**, v.73, p.304-313, 2007.

[127] THOMPSON, T.S.; PERNAL, S.F.; NOOT, D.K.; MELATHOPOULOS, A.P.; VAN DEN HEEVER, J.P. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.304-311, 2007.

- [128] LI, H.; KIJAK, P.J.; TURNIPSEED, S.B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: a multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.836, p.22-38, 2006.
- [129] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p.174-181, 2005.
- [130] THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p.168-176, 2005.
- [131] STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A Multiresidue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. **Analytica Chimica Acta**, v.547, p.262-268, 2005.
- [132] SOTO-CHINCHILA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCIA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)]oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p.60-67, 2005.
- [133] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y.-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8468-8473, setembro, 2005.
- [134] MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.64, p.87-100, 2004.

- [135] CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDERIS, B.M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta**, v.494, p.21-28, 2003.
- [136] FUH, M.R.; CHU, S.Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p.215-221, 2003.
- [137] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separations conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v. 98, p.153-158, 2003.
- [138] CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and eggs. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, N. 3, p.558-566, 2003.
- [139] REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.225-232, 2003.
- [140] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.153-158, 2003.
- [141] RHIJI, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A.; BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.121-133, 2002.
- [142] VERZEGNASSI, L.; SAVOY-PERROUD, M.-C.; STANDLE, R.H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.77-87, 2002.

- [143] FUH, M.-R.S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, p.1127-1139, 2001.
- [144] LINDSEY, M.E.; MEYER, M.; THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.73, N. 19, p.4640-4646, outubro, 2001.
- [145] NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C.; BERNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p.169-177, 2000.
- [146] DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p.1243-1247, 2000.
- [147] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [148] REEVES, V.B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.723, p.127-137, 1999.
- [149] KENNEDY, D.G.; McCRAKEN, R.J.; CANNAVAN, A.; HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p.77-98, 1998.
- [150] CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M.E.; DIMARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal of Chromatography B**, v. 706, p.269-277, 1998.

- [151] AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.1-40, 1995.
- [152] KRISTLANSEN, G.K.; BROCK, R. Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. **Analytical Chemistry**, v.66, N. 19, p.3253-3258, outubro, 1994.
- [153] NIESSEN, W.M.A.; USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. **Analyst**, v.119, p.2543-2548, dezembro, 1994.
- [154] PORTER, S. Confirmation of sulfonamides residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, v.119, p.2753-2756, 1994.
- [155] SHETH, H.B.; SPORNS, P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.1696-1700, 1991.
- [156] UMAGAT, H.; McGARRY, P.F.; TSCHERNE, R.J. Stability indicating sulfa drug analysis using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, N. 7, p.922-924, 1979.

9. ANEXOS



9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Quadro 01 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel – PNCR/2007.

Grupo	Analito	Matriz	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR/NA* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	Mel	CLAE/UV	25	200	7
	Oxitetraciclina (a)					
	Tetraciclina (a)					
	Sulfatiazol (b)	Mel	CLAE/UV	25	100	15
	Sulfadimetoxina (b)					
	Sulfadiazina					
	Sulfaquinoxalina					
	Sulclorpiridazina	Mel	CL/EM-EM	0,5	1(I)*	30
	Nitrofurazona – SEM					
	Furazolidona – AOZ					
	Furaltadona – AMOZ					
	Nitrofurantoina - AHD					
	Tilosina	Mel	CL/EM-EM	0,5	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	Mel	CG/EM-EM	10	10	15
	Alfa-endosulfan			10	10	
	4,4-DDE			10	10	
	4,4-DDD			10	10	
	4,4 DDT			10	10	
	Dodecacloro			10	10	
	Endrin			10	10	
	Iprodiona			50	50	
	Tetradifona			20	20	
	Captana			50	50	
	Lindane			10	10	

Fonte: BRASIL [57].

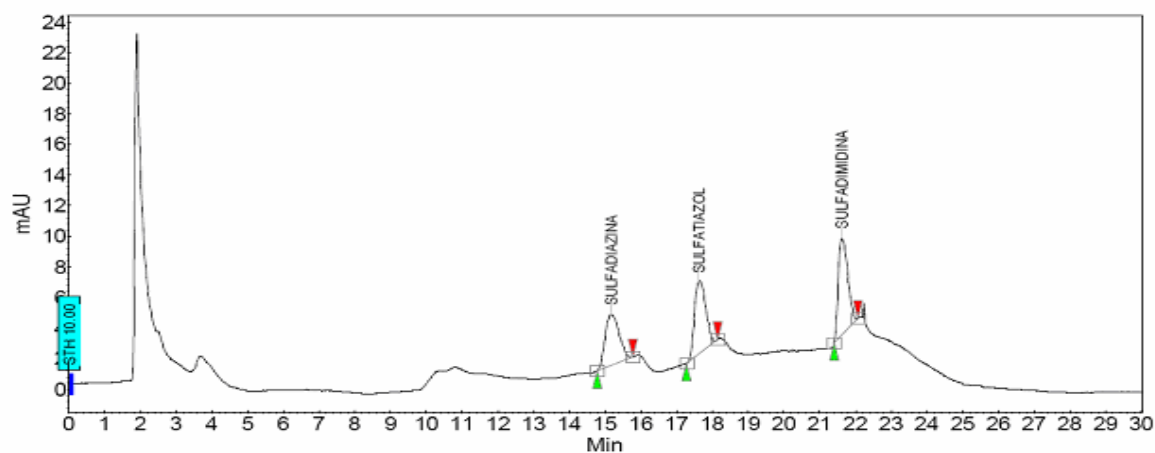
9.2 ANEXO 2

Quadro 02 – Distribuição dos valores do teste “*t*” de Student

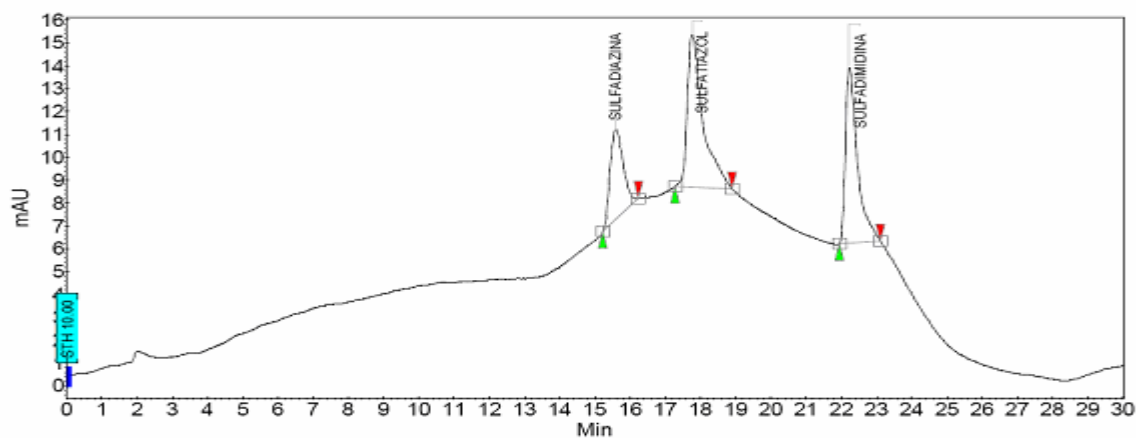
GL (n)	t _{95%}
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086

Fonte: Instituto de Qualidade e Metrologia [2002].

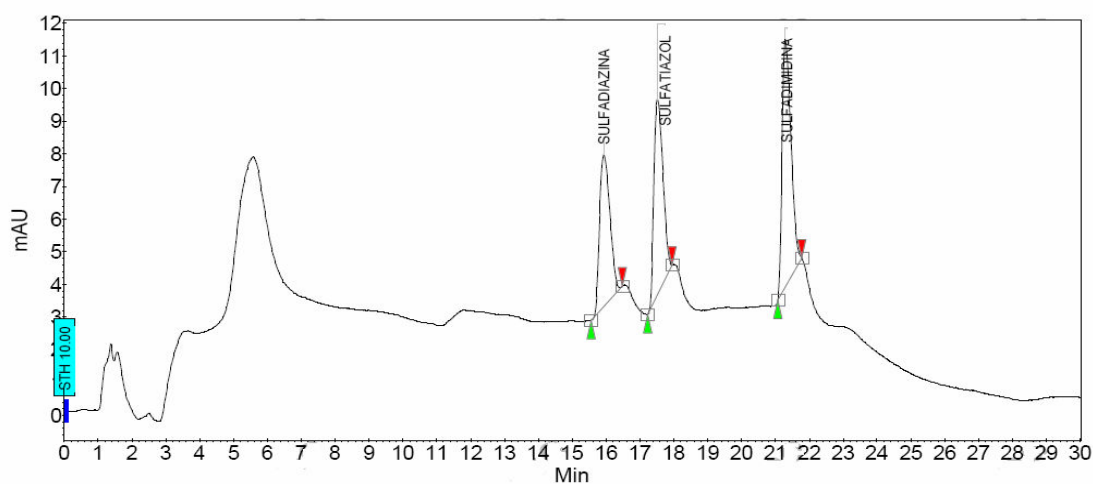
9.3 CROMATOGRAMAS DOS TESTES DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL



(a)

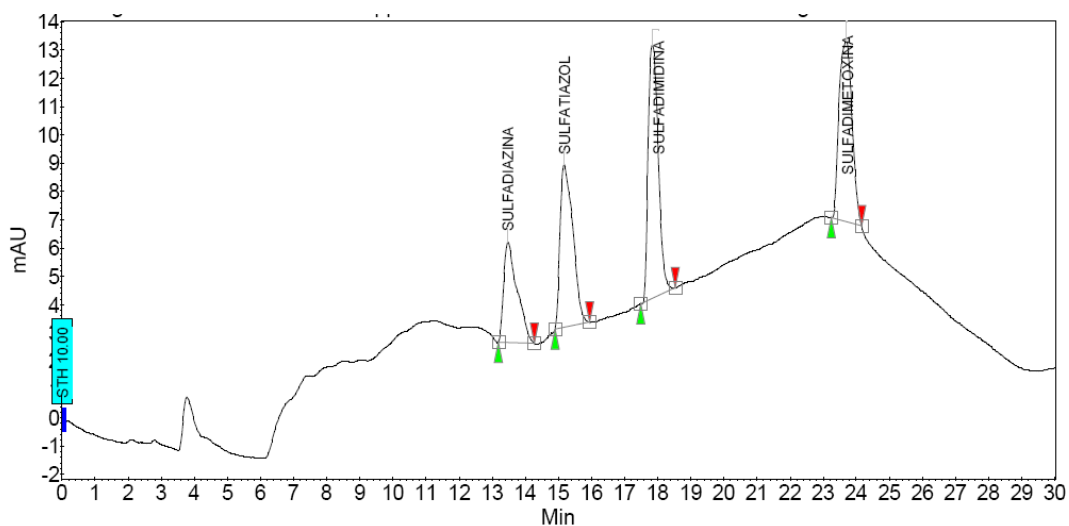


(b)

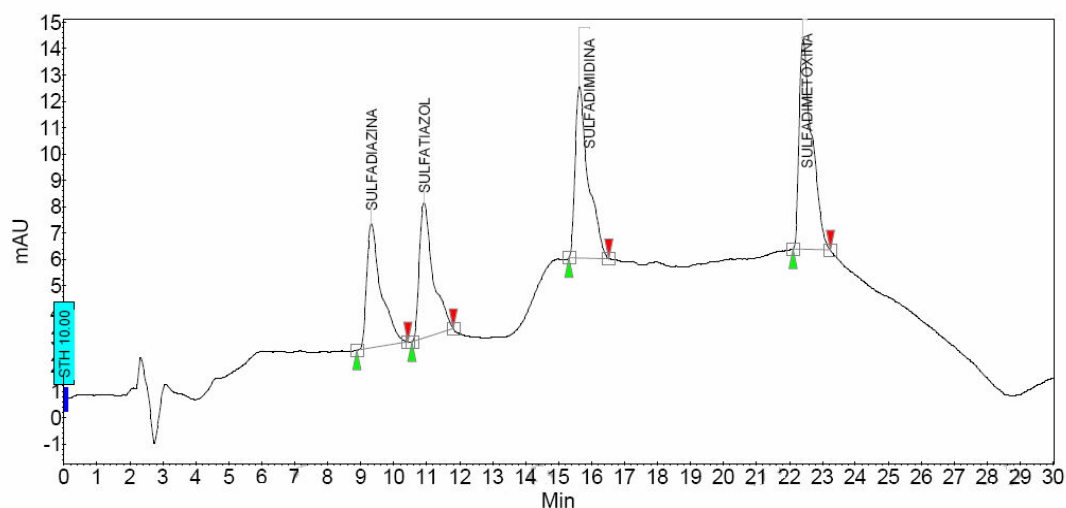


(c)

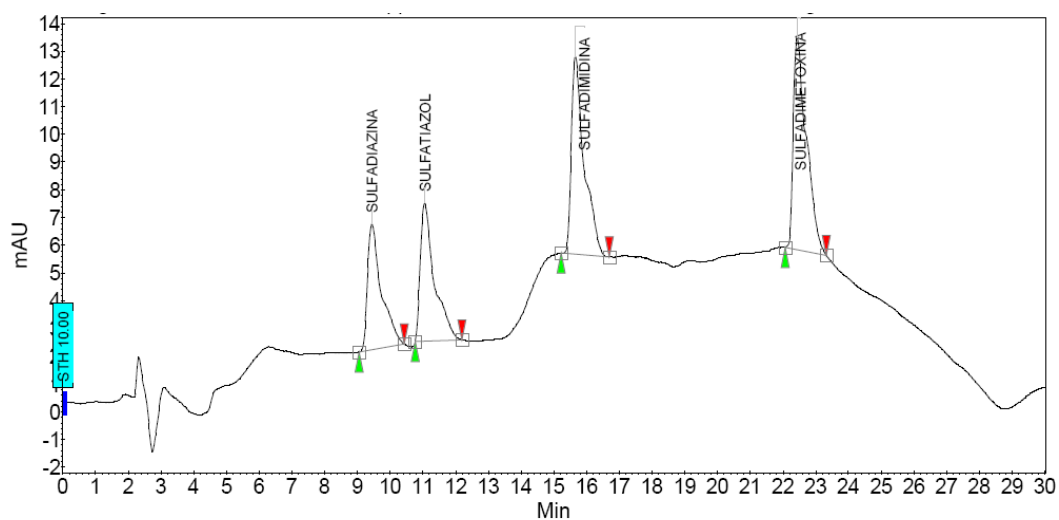
Figura 35 -Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5/Metanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 36 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

São Luís
2008

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco

São Luís
2008

Silva, Verônica Alves Gonçalves da

Desenvolvimento de metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos/ Verônica Alves Gonçalves da Silva. São Luís, 2008.

130f.

Orientador: Teresa Cristina R. dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Química. São Luís, 2008.

1. Mel – resíduos de sulfonamidas. 2. Produção de mel. 3. Extração em fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina R. dos Santos, orient. II. Título.

CDU 658.56:638.14.06

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^ª. Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco
(Orientadora)**

**Prof^º Dr. Laerte da Cunha Azeredo
(DEQUI/UFRRJ)**

**Prof^º Dr. Fernando Carvalho
(DETEQUI/UFMA)**

A Deus e a Nossa Senhora...

Aos meus pais: Maria da Penha Alves da Silva
e Êulete Gonçalves da Silva.

Ao meu amor, Fábio Silveira Vidal.

À minha sobrinha: Iracema D'monik Miranda
Gonçalves da Silva.

E ao meu irmão Fabrício C. G. da Silva.

Por todo amor, carinho e paciência.

E pelo incansável incentivo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos memoráveis, coisas inexplicáveis e pessoas inesquecíveis”.

Ao nosso Deus, Todo Poderoso, meu Mestre, meu Pastor, meu Senhor, por ter me dado coragem para superar todas as dificuldades, por nunca me desamparar!... A Nossa Senhora, que tanto me inspira, em todos os momentos, tirando-me de todas as dificuldades e levando-me a serenidade.

Aos meus pais, que me fornecem a força necessária para tudo na minha vida, por terem me educado tão bem, ensinando-me valores essenciais para ser uma boa pessoa e uma profissional consciente e de muita ética. Agradeço ao meu pai pelo exemplo de pessoa culta e a minha mãe pelo exemplo de professora dedicada. Agradeço também à valiosa lição de sempre me mostrarem que sozinhos não somos nada, mas somos muito mais com a ajuda dos amigos.

Aos meus tios, tia Cida e tio Laerte, por desde cedo me ensinarem a amar a química e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada também por me ensinarem a superar obstáculos estudando.

Ao meu noivo Fábio Silveira Vidal, que tão pacientemente ouviu todas as minhas dúvidas, afagou minhas tristezas, pelo carinho, pelo companheirismo, pelas horas que passou comigo estudando química e pelo seu generoso amor que tanto me incentivou em todas as atividades sempre acreditando que eu iria conseguir.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, por me acolher tão carinhosamente, por seu incentivo durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório NARP pela convivência.

Ao amigo, José Crediciomar pelo apoio, incentivo, paciência (para me ensinar a utilizar o equipamento (HPLC)) e pela grande demonstração de amizade.

Aos meus amigos: Gilvan, Raphael e Álvaro, amigos que fiz e aonde quer que eu vá levarei em meu coração. Agradeço a cumplicidade e agradável convívio, as conversas e os bons momentos compartilhados. Raphael te agradeço mais ainda pela grande ajuda na finalização desta pesquisa, muito obrigada meu amigo!

A querida amiga e bibliotecária, Rosivalda Pereira, pela acolhida fantástica, pelas adoráveis e produtivas conversas na biblioteca do CCET e pela grande ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

A amiga Cláudia Guerra pela convivência, pelo carinho, amizade e por ser minha família em São Luís.

Ao Prof^o José Wilson pela amizade e orientação profissional, desde a disciplina de catálise continuando seus ensinamentos por todo o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química: Marise e Daniele, aos funcionários do Departamento de Tecnologia Química: Alba, Ivaldo e de outros setores da UFMA, em especial a Dona Eunice e Senhor Alberto, pela constante disposição em me ajudar na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“A pesquisa científica consiste em
ver o que todo mundo já viu, mas
pensar em algo que ninguém pensou
ainda”.*

(Albert Szent-Györgyi)

RESUMO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável, não sendo permitido a presença de aditivos e/ou agentes conservadores. Na apicultura as sulfonamidas são muito utilizadas na prevenção e controle de doenças em colméias, como a cria pútrida americana causada pelo *Paenibacillus larvae*. Uma consequência desta prática é a presença destes resíduos no mel, o que pode causar reações alérgicas nos consumidores. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas no mel. No Brasil, a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A realização de programas de monitoramentos de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando possíveis danos à saúde do consumidor. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico multiresidual para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel de abelhas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A metodologia estabelecida consistiu nas seguintes condições: extração em fase sólida com sorvente Nexus, eluição com 5 mL de acetonitrila e reconstituição com solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, com adição de 1% de metanol, separação em coluna analítica C18, fase móvel acetonitrila e água, no modo de eluição em gradiente e detecção a 278 nm. O preparo de amostra consistiu na hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} de uma alíquota de mel e ajuste para pH 4,5 com solução tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. O método foi validado e os resultados demonstraram exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Foi encontrada boa faixa de linearidade, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 41 a 89% e estimativa do desvio padrão relativo variando entre 2,36 e 14% para os quatro compostos estudados. Os limites de detecção das quatro sulfas em amostra de mel variaram de 20 a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 60 a $90 \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para as concentrações totais de SDZ, STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite adequada determinação das quatro sulfas em amostras de mel de abelhas.

Palavras-chave: Sulfonamidas. CLAE-DAD. Extração por fase sólida. Validação. Mel.

ABSTRACT

Honey is a natural substance produced by bees and by your nature it is considered a healthy product. Presence of additives and/or preserve agents is not permitted. On apiculture, sulfonamides are largely used on prevention and control of beehive disease, such as American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. A consequence of this practice is the presence of these residues in honey, that should cause allergy reactions on consumers. In the last years, some published works is discussing the presence of antibiotic and sulfonamides residues in honey. In Brazil, the presence of antibiotics residues in food is controlled by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and by the Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). The realization of monitoring contaminants residues in food programs, as well as the Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) from MAPA are essentials to the sanitary vigilance actions development, preventing and controlling possible hazard to the consumer health. This work has the objective the development and validation of multiresidue analytical method to the sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidine and sulfadimethoxine determination in bee honey using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). The established methodology consisted on such conditions: solid phase extraction with Nexus sorbent, elution with acetonitrile 5 mL, and reconstitution with sodium acetate buffer (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5, with 1% methanol addition, separation on analytical column C18, acetonitrile and water mobile phase, on gradient elution mode and detection on 278 nm. The sample preparation consisted on the acid hydrolysis with hydrochloric acid 2 mol L⁻¹ of a honey rate and adjust to pH 4,5 with sodium acetate buffer solution 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5. The method was validated and the results demonstrated accuracy and precision between the limits established by the current legislation. Good linearity range was encountered, obtaining recovery values varying from 41 to 89% and relative standard deviation estimative varying between 2,36 and 14% to the four studied compounds. The four sulfonamides detection limits in honey sample varying from 20 to 30 µg kg⁻¹ and the quantification limits varied from 60 to 90 µg kg⁻¹. Considering 100 µg kg⁻¹ the residue maximum limit established by the Brazilian legislation to the SDZ, STZ, SMZ and SDM total concentration, the described method permit suitable determination of the four sulfonamides in bee honey.

Keywords: Sulfonamides. HPLC-DAD. Solid phase extraction. Validation. Honey.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 2	Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.....	45
Quadro 3	Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.....	49
Quadro 4	Testes para seleção da composição da fase móvel.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição típica do mel.....	24
Tabela 2-	Propriedades gerais das sulfonamidas.....	27
Tabela 3-	Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.....	38
Tabela 4-	Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.....	64
Tabela 5-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	67
Tabela 6-	Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.....	74
Tabela 7-	Estudo da composição da fase móvel.....	80
Tabela 8-	Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.....	83
Tabela 9-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	87
Tabela 10-	Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)....	90
Tabela 11-	Resultados dos testes de eficiência de extração.....	91
Tabela 12-	Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.....	93
Tabela 13-	Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 14-	Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão.....	97
Tabela 15-	Parâmetros de validação para o método desenvolvido.....	98
Tabela 16-	Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.....	100
Tabela 17-	Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.....	102
Tabela 18-	Análise de amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de mel no Brasil.....	23
Figura 2	Diferentes tipos de mel.....	24
Figura 3	Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas: (a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.....	26
Figura 4	Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida)...	27
Figura 5	Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.....	28
Figura 6	(a) Esquema de cartucho para EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.....	44
Figura 7	Principais etapas empregadas EFS.....	45
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.....	50
Figura 9	Processo de fortificação das amostras.....	54
Figura 10	Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.....	59
Figura 11	(a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.....	60
Figura 12	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.....	63
Figura 13	Procedimentos experimentais empregados nas etapas de extração EFS.....	69
Figura 14	Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.....	72
Figura 15	Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.....	75
Figura 16	Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatógrafo: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm.....	76
Figura 17	Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, 1,0 mg L ⁻¹ , usando C ₁₈ (cromatograma vermelho), C ₈ (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).....	77
Figura 18	Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto).....	78
Figura 19	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água.....	81

Figura 20	Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,5.....	82
Figura 21	Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L ⁻¹	84
Figura 22	Estudo da degradação das soluções-padrão.....	84
Figura 23	Esquema da reação açúcar-sulfonamida.....	86
Figura 24	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , sem hidrólise ácida.	88
Figura 25	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , com hidrólise ácida.	89
Figura 26	Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de <i>clean-up</i>	92
Figura 27	Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹	93
Figura 28	Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.....	95
Figura 29	Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).....	96
Figura 30	Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de 100 ng g ⁻¹	100
Figura 31	Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá	102
Figura 32	Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.....	103
Figura 33	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins.....	103
Figura 34	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí.....	103
Figura 35	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L ⁻¹) pH 4,5/Metanol.....	129
Figura 36	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
C8	Fase estacionária do tipo octilsilano
CODEX	<i>Codex Alimentarius</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido com detector por arranjo de fotodiodos
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
CL	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida - EFS)
t _R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Detector por absorbância no ultravioleta-visível

LISTA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
STZ	Sulfatiazol
SAD	Sulfanilamide
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SID	Sulfisomidina
SMTX	Sulfametoxazol
SDM	Sulfadimetoxina
SBM	Sulfabenzamida
SDX	Sulfadoxina
SQX	Sulfaquinoxalina
SME	Sulfameter
SMX	Sulfamoxol
SMP	Sulfametoxipiridazina
SCP	Sulfacloropiridazina
SSZ	Sulfasalazina
SMDZ	Sulfametoxidiazina
SMTT	Sulfametiltiazol
SMM	Sulfamonometoxina
SAI	Sulfisoxazol
SCT	Sulfacetamida
SGN	Sulfaguanidina
SMT	Sulfametizol
STR	Estreptomicina
DHS	Diidroestreptomicina
CAP	Cloranfenicol
OTC	Oxitetraciclina
AMP	Ampicilina
TC	Tetraciclina
DMC	Democlociclina
CTC	Clorotetraciclina
NEO	Neomicina
PENG	Penicilina G
SPI	Espiramicina
DC	Doxiciclina
PEN	Penetamato
DES	Desmicosina
OLE	Oleandomicina
TIL	Tilmicosina
TYL	Tilosina
OXA	Oxacilina
EA	Eritromicina
CLOX	Cloxacilina
NAF	Naficilina
DIC	Dicloxacilina
ROXI	Roxitromicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µ	Micron
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	Minuto
sec	Segundo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
R ²	Coefficiente de Determinação ou de Correlação Múltipla ou Eficiência da Regressão
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Amostral
t	t de <i>Student</i>
$\bar{X}$	Média aritmética
x _i	Valor Medido
Σ	Somatório
√	Raiz quadrada
σ	Desvio padrão da população

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	22
1.1.1	Características físico-químicas do mel.....	23
1.1.2	Doenças nas abelhas e na colméia.....	25
1.2	SULFONAMIDAS.....	26
1.2.1	Resíduos de sulfonamidas no mel.....	29
1.2.2	Aspectos da legislação.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS.....	35
3.1	PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	43
3.1.1	Extração por Fase Sólida (EFS).....	43
4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.1	FAIXA DE APLICAÇÃO.....	49
4.2	LINEARIDADE.....	51
4.3	SELETIVIDADE.....	51
4.4	PRECISÃO.....	52
4.4.1	Repetitividade.....	52
4.4.2	Precisão intermediária.....	53
4.4.3	Reprodutibilidade.....	53
4.5	EXATIDÃO.....	53
4.5.1	Recuperação.....	54
4.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	55
4.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	56
5.	MATERIAIS E MÉTODO.....	58
5.1	METODOLOGIA.....	58
5.1.1	Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas.....	58
5.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	60

5.2.1	Padrões.....	60
5.2.2	Reagentes e Solventes.....	60
5.2.3	Dispositivos para Extração por Fase Sólida.....	60
5.2.4	Coluna Cromatográfica.....	61
5.2.5	Equipamentos.....	61
5.2.6	Outros materiais.....	62
5.3	MÉTODO.....	62
5.3.1	Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas.....	63
5.3.1.1	Seleção da coluna.....	64
5.3.1.2	Linha de Base do Solvente.....	64
5.3.1.3	Conformidade do Sistema.....	64
5.3.1.4	Seleção do Comprimento de onda.....	65
5.3.1.5	Seleção da fase móvel.....	65
5.3.1.6	Preparação dos padrões.....	65
5.3.2	Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração.....	66
5.3.2.1	Pré-tratamento da amostra.....	66
5.3.2.2	Seleção do adsorvente.....	67
5.3.2.3	Condicionamento dos cartuchos.....	67
5.3.2.4	Eluição dos analitos.....	68
5.3.2.5	Extração por EFS.....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	69
5.4.1	Seletividade.....	70
5.4.2	Linearidade.....	70
5.4.3	Limites de Detecção e de Quantificação.....	70
5.4.4	Estudo de recuperação.....	71
5.4.4.1	Precisão.....	71
5.4.4.2	Exatidão.....	71
5.5	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1	SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	74
6.2	SELEÇÃO DA COLUNA.....	77
6.3	SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	77
6.3.1	Seleção do pH da fase móvel.....	78

6.3.2	Composição da fase móvel.....	79
6.3.3	Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho.....	82
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	83
6.5	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS.....	85
6.5.1	Pré-tratamento da amostra.....	85
6.5.2	Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração em fase sólida.....	90
6.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	94
6.6.1	Conformidade do sistema.....	94
6.6.2	Seletividade.....	95
6.6.3	Curva analítica.....	96
6.6.4	Faixa linear, linearidade, sensibilidade.....	97
6.6.5	Limites de detecção e quantificação.....	97
6.6.6	Precisão e Exatidão.....	98
6.6.6.1	Precisão.....	98
6.6.6.2	Exatidão.....	99
6.6.6.3	Avaliação estatística do método.....	101
6.7	ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	101
7.	CONCLUSÃO.....	106
8.	REFERÊNCIAS.....	108
9.	ANEXOS.....	127
9.1	ANEXO 1.....	127
9.2	ANEXO 2.....	128
9.3	ANEXO 3.....	129

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável. A adição de aditivos e agentes conservadores no mel não é permitida. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas em mel. Antibióticos são principalmente usados na apicultura para o tratamento de doenças bacterianas ou outros tipos de doenças infecciosas [1].

Para aceitação do produto apícola, no Brasil, é necessário que o produto obedeça ao regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A legislação vigente é descrita na Instrução Normativa N. 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [2]. A citada norma define tipos de mel, procedimento de obtenção, apresentação e/ou processamento, além de estabelecer limites para os dez principais parâmetros físico-químicos, importantes na avaliação da pureza, maturidade e possível adulteração do mel.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro no mercado externo, é necessário que o produto cumpra as exigências estabelecidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), mais especificamente do Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM [3]. O programa visa atender às exigências do mercado externo, em especial da Comunidade Européia, responsável por mais de 90% da exportação de mel brasileiro e estabelece, dentre outras coisas, a avaliação quanto à presença de resíduos no produto, o potencial da utilização inadequada de drogas no produto e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas. Várias classes de substâncias tóxicas são incluídas neste programa, mais especificamente organoclorados, antibióticos, metais pesados, substâncias promotoras de crescimento, tireostáticos e sulfonamidas.

A ausência de controle de resíduos no mel brasileiro foi a principal justificativa para o embargo ocorrido em 2006 na União Européia [4]. Uma das grandes preocupações do mercado apícola atual é a eliminação total de resíduos de antibióticos e defensivos agrícolas no mel. Utilizados para prevenir e tratar enfermidades nas abelhas e doenças de origem bacteriana na colméia fora da época de florada, os antibióticos, se utilizados sem o devido controle, podem causar prejuízos a qualidade do mel. A restrição do comércio internacional baseia-se no fato de que tais substâncias poderiam atingir o consumidor, que estaria ingerindo o mel contaminado, acarretando danos à sua saúde, tais como, adaptação e resistência de

bactérias no organismo. Por este motivo é que, recentemente, alguns países compradores de mel têm incluído em suas exigências um produto apícola livre de antibióticos.

Embora o uso de antibióticos em colméias seja uma prática constante dos apicultores, o Brasil possui um grande diferencial no contexto mundial, visto que existem poucos registros de doenças comuns em abelhas, principalmente na região Nordeste.

Sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, na apicultura, são utilizadas no tratamento e prevenção da “cria pútrida” em abelhas, doença provocada pelo *Paenobacillus larvae*. Uma consequência direta do uso é a ocorrência de resíduos de sulfonamidas no mel de abelhas, o que compromete a qualidade do produto [5].

Estudos para estes compostos incluem procedimentos colorimétricos como a reação de Bratton-Marshall [6;7]; cromatografia em camada delgada (CCD) [8], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) [9, 10; 11; 12; 13; 14; 15 e 16, dentre outros], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) [17; 18; 19; 20 e 21, dentre outros] espectrometria de massas no modo “tandem” (CLAE-EM ou CLAE-EM/EM) [22; 23; 24; 25; 26; 27 e 28, dentre outros].

A literatura atualmente disponível para análise de sulfonamidas em mel ressalta a especificidade da matriz com relação à aplicação de métodos analíticos. No Brasil, existem poucos trabalhos com sulfonamidas em mel. A disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos apícolas, quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, é essencial para fornecer aos apicultores garantias sobre a qualidade de seu produto, garantindo-lhes condições de exportar. Pelo exposto é que veio o interesse em fazer esta pesquisa. Este trabalho também poderá ser utilizado como um incentivo na realização de novos estudos envolvendo sulfonamidas em alimentos (matrizes diferentes de mel).

1.1 MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS

O Brasil tem um grande potencial apícola, devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variedade edafoclimática existente, o que possibilita produzir mel o ano todo [29]. A apicultura é uma atividade que se enquadra no tripé da sustentabilidade podendo favorecer programas de desenvolvimento econômico, social e ecológico como os existentes no Nordeste brasileiro. Em 2004 o Brasil alcançou a posição

de 11º produtor mundial de mel (40 mil toneladas) e o 5º exportador mundial (21 mil toneladas). No cenário mundial, os principais produtores de mel são China, Estados Unidos e Argentina e os maiores exportadores são China, Argentina, México e Alemanha. No Mercosul, o Brasil é superado apenas pela Argentina. A produtividade brasileira ainda é baixa [3].

Dos produtos apícolas o mel é o que tem maior destaque para o comércio. A região Sul é a principal região produtora de mel no país com 47,72%. A região Nordeste vem na segunda posição com 31,58% da produção, seguida das regiões Sudeste (16,22%), Centro-Oeste (2,87%) e Norte (1,62%) [3].

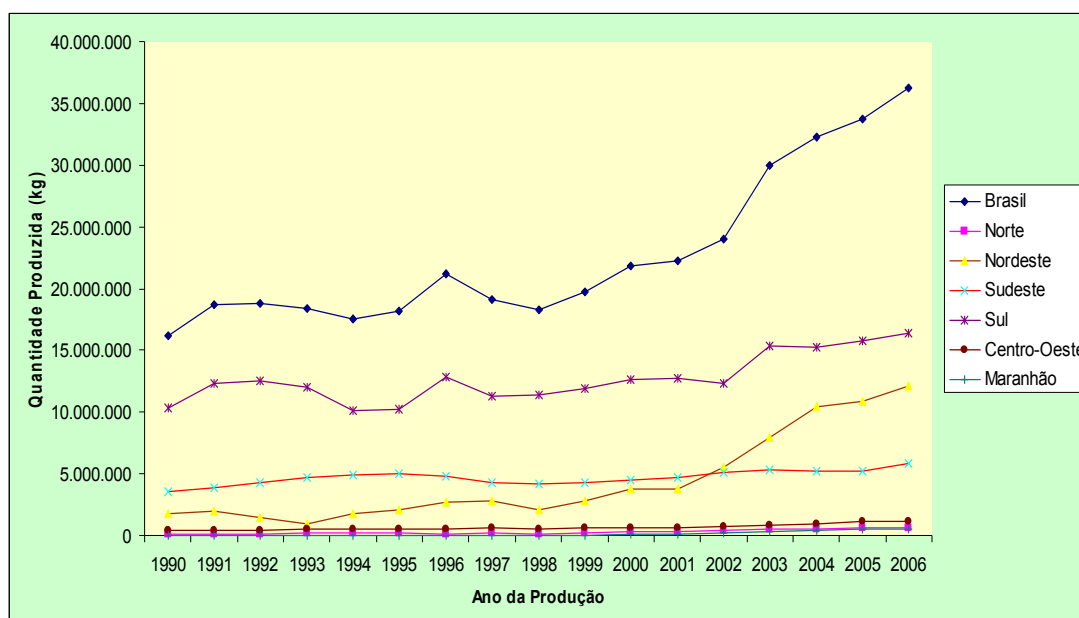


Figura 1 – Produção de mel no Brasil.

Fonte: adaptado de [30]

Segundo dados do IBGE [31] o Maranhão, no ano de 2005, passou a ocupar a 10ª posição no *ranking* nacional, tendo alcançado um aumento de produção de 289 % em relação à estatísticas realizadas pelo mesmo órgão no ano de 2001, comprovando-se o grande potencial de produção do estado.

1.1.1 Características físico-químicas do mel

O mel (Figura 2) é um produto biológico muito complexo, devido a sua composição variar com a flora e ser influenciado pelas condições climáticas e edafológicas da

região onde foi produzido [32]. Segundo Crane [33] mel é o resultado da desidratação e transformação do néctar, portanto a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar.



Figura 2- Diferentes tipos de mel.

Fonte: Internet: [34]

A composição físico-química do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais também estão diretamente relacionados com a fonte do néctar que o originou e assim como com a espécie da abelha que o produziu [32]. A Tabela 1 apresenta uma visão geral da composição química do mel.

Tabela 1 - Composição típica do mel.

Componente	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76-1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 -40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020-1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	----
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68-59,49	10,33
Proteína (%)	0,1686	0,0577-0,567	7,09

Fonte: NATIONAL HONEY BOARD [35].

Sabor e aroma. O sabor e aroma característicos do mel são conferidos pela presença dos compostos voláteis. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado

diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-los dos favos [36]. Os aromas podem ser classificados em característico, adocicado, floral, cera e queimado. Já o sabor pode ser classificado como característico, adocicado, floral, cera, queimado, ácido e residual.

Cor. “A coloração do mel” é normalmente interpretada como algo mais escuro que creme e mais claro que marrom. A cor do mel líquido pode realmente variar de branco-aquoso a próximo de preto, com variantes tendendo para matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul [33].

Água. O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% [37]. Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. A quantidade de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade [32].

Açúcares. O poder adoçante do mel é avaliado em cerca da metade do atribuído ao mesmo peso de açúcar de cana [33]. Além da doçura, os açúcares são responsáveis por outras características, tais como: capacidade de conservação, poder higroscópico e habilidade de promover cor e sabor [38]. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5% a 40% para a glicose e de 36,2% a 49,6% para a frutose, de acordo com a florada [39].

Diversos. Outros componentes importantes presentes no mel são as enzimas, os aminoácidos, os ácidos orgânicos e minerais.

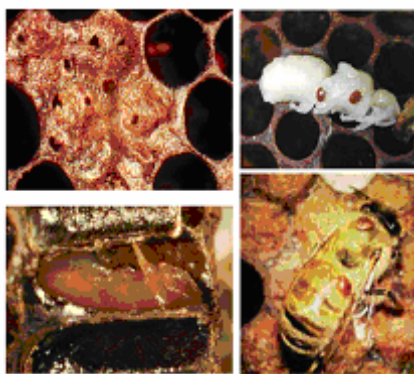
1.1.2 Doenças nas abelhas e na colméia

Assim como em seres humanos as abelhas são susceptíveis a numerosas enfermidades, necessitando de tratamentos adequados à base de fármacos como as sulfonamidas para prevenção e/ou tratamento destas. Na Figura 3 são apresentadas as doenças que mais afetam abelhas e colméias. Dentre as enfermidades que mais as afetam está a cria pútrida.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (*American Foulbrood*), é produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas [40; 41]. O tratamento ocorre pela administração dos antibióticos na água ou através de alimentação artificial contendo a medicação, geralmente administrada, antes da florada [42].

Este tipo de doença quando acontece é capaz de dizimar dezenas de colméias, sendo uma enfermidade muito temida pelos apicultores.

O Brasil tem se destacado no cenário internacional por ter praticamente erradicado esta doença. A grande questão que envolve doenças na apicultura, assim como em outras atividades produtoras de alimentos, é a utilização de fármacos na prevenção ou tratamento destas. As sulfonamidas são compostos que podem ter sua ação prolongada por muito tempo dependendo do tipo de matriz a qual ela está presente [43]. O uso inadequado de fármacos na prevenção ou controle de doenças na colméia pode acarretar danos a qualidade do produto e causar problemas na saúde do consumidor, uma vez que a contaminação do mel com resíduos de sulfonamidas numa colméia mantém-se durante anos.



(a)

(b)

Figura 3 – Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas:
(a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.
Fonte: Internet: [44]

1.2 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, tendo sido desenvolvidas em 1935, pelo cientista Gerhard Domagk [45]. São compostos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Figura 4). Sua classificação é realizada com base no grau de absorção pelo trato gastrointestinal e através da duração de seu efeito [46].

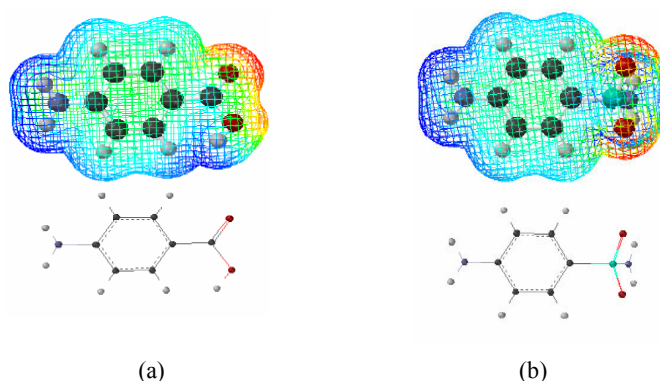


Figura 4 - Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida).
 Fonte: Internet: [47]

Possuem ação bacteriostática e atuam competindo com o ácido *p*-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico, agindo de forma sistêmica, com ação de curta ou longa duração, dependendo do tipo [48].

Os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana das sulfonamidas estão reunidos na própria molécula da sulfanilamida. O grupo – SO₂NH₂ não é essencial em si, mas tem a importante característica do enxofre estar diretamente ligado ao anel benzênico [48].

Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, *pKa*, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica [48].

Quimicamente, as sulfonamidas são ácidos fracos, relativamente insolúveis em água, que apresentam *pKa* variado e são iônicas por natureza [49]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas relevantes das sulfonamidas em estudo nesta pesquisa.

Tabela 2 – Propriedades gerais das sulfonamidas.

Composto	CAS- Number	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)*	Sol. em H ₂ O* (mg /100 mL)	Log K _{ow}	<i>pKa</i>
Sulfadiazina	[68-35-9]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.26	13	0,12 ^b	6,50
Sulfadimetoxina	[122-11-2]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1	1,4 ^a	6,21
Sulfadimidina	[57-68-1]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	272.33	192	0,25 ^a	7,45
Sulfatiazol	[72-14-0]	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.32	1	--	7,24

Fonte: *[50] ; ^a [27]; ^b [51]

A solubilidade das sulfonamidas varia muito em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional. Em meios alcalinos a solubilidade é maior que em pH neutro e ácidos, aumentando em meio ácido de sais sódicos [52].

Em sua molécula as sulfonamidas contêm um grupo amina básico (-NH_2) e um grupo amida ácido (-NH-) que correspondem ao $\text{p}K_{a1}$ e $\text{p}K_{a2}$, respectivamente; apresentando caráter anfótero, ou seja, em soluções básicas o comportamento das sulfonamidas é ácido, devido ao N1 (nitrogênio ácido, que apresenta capacidade de doar prótons), já em soluções ácidas o comportamento das sulfonamidas é básico, devido ao N4 (nitrogênio básico - que apresenta capacidade de captar prótons). A completa ionização é conseguida quando o pH do analito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de $\text{p}K_a$, para compostos ácidos e básicos, respectivamente [53].

Na Figura 5 é apresentado um esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio. Em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

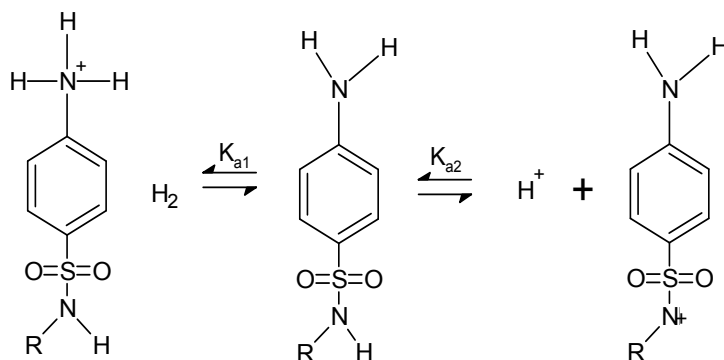
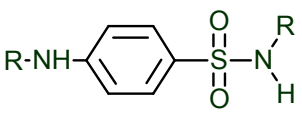
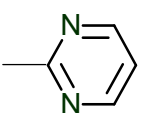
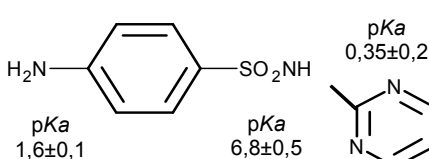
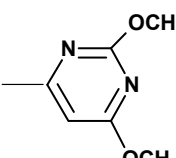
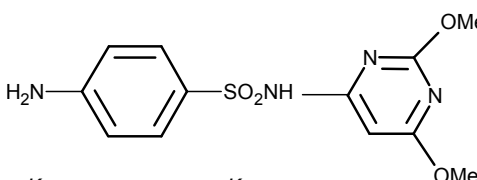
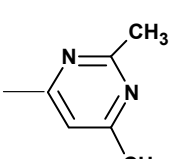
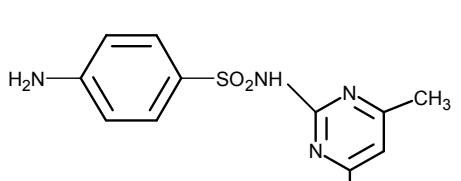
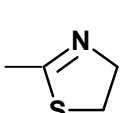
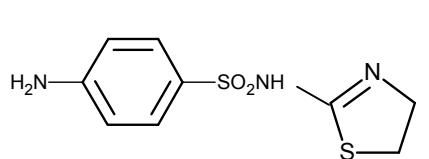


Figura 5 – Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.
Fonte: [53]

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares das sulfonamidas selecionadas para este estudo, bem como as variações dos valores de $\text{p}K_a$ dos respectivos grupos funcionais das sulfonamidas.

Fórmula Geral das Sulfonamidas		
		
Sulfonamida	Radical	Estrutura Completa
Sulfadiazina (SDZ)		 pK_a 1,6±0,1 pK_a 6,8±0,5 pK_a 0,35±0,2
Sulfadimetoxina (SDX)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfadimidina (SDD)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfatiazol (STZ)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5

Quadro 1 – Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo
 Fonte: adaptado de [51], [54] e [23].

1.2.1 Resíduos de sulfonamidas no mel

No que se refere à saúde pública, o monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos vem-se tornando um assunto cada vez mais discutido em nível mundial [51]. Uma grande variedade de fármacos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses,

os das classes: sulfonamidas, betalactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos [55].

Atualmente, grandes volumes de mel são solicitados por mercados internacionais, fazendo com que novas práticas apícolas sejam implantadas a fim de garantir que a produção esteja protegida de possíveis ataques de pragas, doenças ou contaminações [3].

A utilização de fármacos na prevenção e/ou tratamento de doenças na colméia é prática comum entre os apicultores. Resíduos de sulfonamidas podem ocorrer no mel como consequência da utilização destes fármacos no tratamento de doenças de origem bacteriana. A presença de resíduos de sulfonamidas no mel não é desejável, uma vez que o mel é um produto natural e saudável e que, como tal, não deve apresentar substâncias comprovadamente tóxicas.

As exposições de humanos a doses de resíduos de fármacos podem gerar possíveis efeitos prejudiciais à saúde do consumidor. Os efeitos mais comumente encontrados são reações alérgicas, desordens na flora intestinal e possível impacto da resistência de antimicrobianos utilizados em terapia humana. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se, ainda, que aproximadamente 5% dos pacientes humanos tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [56]. Deve-se salientar, entretanto, que ainda não existem evidências científicas demonstrando que esta associação seja decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [57].

1.2.2 Aspectos da legislação

Visando proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores em saúde pública estabeleceram níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) quanto à presença de fármacos em alimentos de origem animal [57]. O LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduo com o qual não ocorra perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) [52].

No Brasil, o Ministério da Saúde é quem estabelece os LMR e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os responsáveis pelas ações fiscais de vigilância do uso de fármacos em alimentos.

Na produção de produtos de origem animal o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do MAPA. O PNCR tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do mel e de outros produtos de origem animal, no território nacional, bem como o aporte dos produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas aos conhecimentos das violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais. Para isto, são colhidas amostras dos alimentos, junto aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) [57].

O LMR de sulfonamidas em mel fixado pelo PNCR é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina (Quadro 01, ANEXO 1).

A ANVISA, recentemente, vem implantando um Programa de Análise de Resíduos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) para diversos tipos de alimentos (leite, carnes, ovos e mel de abelhas), cujo objetivo é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária [58].

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

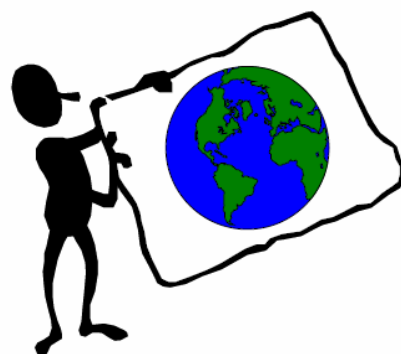
2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para determinar sulfonamidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Comparar diferentes tipos de processos de extração/pré-concentração de sulfonamidas, utilizando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de méis;
- Divulgar a problemática envolvendo a presença de fármacos em alimentos.

3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS



3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que procedimentos de controle de qualidade de alimentos sejam realizados a fim de verificar a presença de resíduos de sulfonamidas e outros contaminantes. O desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença destes resíduos em diferentes matrizes alimentícias tornam-se fundamentais [52]. Segundo Davidson e Branem [59], o monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de medicamentos veterinários tem aumentado devido à importância da repercussão em saúde pública.

A determinação de resíduos de sulfonamidas envolve quantificação de concentrações muito baixas, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. As técnicas analíticas mais comumente usadas para a quantificação destes resíduos são as cromatográficas, associadas a diferentes sistemas de detecção, tais como UV, arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas [52].

A cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos tem sido utilizada com êxito para determinar vários resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal [18]. Embora atualmente muitos métodos confirmatórios como, o CLAE-EM/EM, para a determinação de sulfonamidas em alimentos sejam citados na literatura, estes tipos de determinação requerem o uso de equipamentos caros sendo, portanto, de menor disponibilidade na maioria dos laboratórios de química, principalmente em universidades [60].

A análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento, extração e/ou *clean up* da amostra [49] devido à necessidade de separar, de uma matriz orgânica complexa, compostos em concentrações bastante baixas, de forma a minimizar a presença de interferentes na matriz.

Vários métodos de determinação das sulfonamidas em alimentos estão disponíveis na literatura internacional. Dentre os trabalhos sobre resíduos de sulfonamidas em mel por HPLC pode-se destacar: ZOTOU e VASILIADOU [11]; MAUDENS, ZHANG e LAMBERT [61]; MARTEL e ZEGGANE [62]; PANG *et al.* [63]; HORIE *et al.* [64]; dentre outros.

Zotou e Vasiliadou [11] desenvolveram um método seletivo para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel por SPE-RP-HPLC com detecção UV. A separação das sulfonamidas foi realizada usando coluna C18 (ODS-3), no modo isocrático, e como fase móvel utilizou-se metanol e solução-tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com 1% de ácido acético

(v/v). A detecção UV foi em 263 nm. As amostras de mel foram diluídas em solução-tampão acetato (0,05M) pH 3,6. Utilizou-se cafeína como padrão interno. A extração do resíduo foi realizada usando extração em fase sólida com cartuchos de fase polimérica (Nexus). Recuperações médias dos analitos variaram de 80 a 117%, com limites de detecção de 20 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Maudens, Zhang e Lambert [61] desenvolveram e validaram um método para determinação de doze sulfonamidas (sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina e sulfadoxina) em mel. O pré-tratamento da amostra incluiu uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} , seguida por extração líquido-líquido e extração em fase sólida (utilizando cartucho de troca catiônica). A separação foi realizada utilizando-se coluna RP18, no modo gradiente, e com fase móvel constituída de acetonitrila e solução-tampão acetato (0,020 mol L^{-1}) pH 4,75. A detecção foi realizada em comprimento de excitação de 420 nm e comprimento de emissão de 485 nm. O método demonstrou boa exatidão e precisão. O pré-tratamento da amostra aumentou a eficiência do *clean up*. Foram encontradas recuperações médias, nos três níveis, variando de 38,2 a 66,8% e limites de detecção e quantificação de 1 ou 2 e 2 ou 5 ng g^{-1} , respectivamente.

Martel e Zeggane [62] descreveram um método para determinação de sulfatiazol em mel. Foi realizada uma etapa de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. Uma alíquota da amostra hidrolisada utilizando ácido clorídrico 1 mol L^{-1} e submetido a uma pré-coluna de derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com detector por fluorescência, usando coluna C18 (Hypersil BDS), no modo isocrático, e com fase móvel composta de acetonitrila e solução de ácido acético 2%. Para a detecção por fluorescência foi aplicado um comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. O limite de quantificação foi de 10 ng g^{-1} . As recuperações variaram de 60,6 a 71,8%. A estimativa do desvio padrão relativo variou na faixa de 0,5 a 2,9%.

Pang *et al.* [63] desenvolveram um método para a determinação de oito sulfonamidas (sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido fosfórico (pH 2). As amostras foram filtradas e em seguida procedeu-se à extração em fase sólida utilizando-se dois cartuchos um de troca catiônica e outro OASIS HLB. Procedeu-se à derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada por cromatografia líquida por detecção por fluorescência, usando coluna RP 18, no modo

isocrático, e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e solução de dihidrogeno-fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹. A detecção foi realizada com comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. Recuperações médias nos três níveis de fortificação variaram de 73,5 a 94,1% e coeficientes de variação de 4,35 a 16,60%. O limite de detecção foi de 0,002 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina, e 0,005 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina. O limite de quantificação foi de 0,005 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina e 0,010 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

Horie, Satto e Nose [64] desenvolveram um método usando cromatografia líquida por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) para a determinação simultânea de dez sulfonamidas (sulfatiazol, sulfacloropiridazina e sulfaquinoxalina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 30% e, então, extraídas com diclorometano. Os extratos foram percolados em cartucho de Florisil para realizar um *clean up* na amostra. A separação cromatográfica foi realizada em coluna RP-18 (Lichosphere), como fase móvel utilizou-se solução de dihidrogeno fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹) e acetonitrila. A detecção foi a 275 nm. As recuperações no nível de 0,05 µg g⁻¹ foram de 62,1 a 90,2% e os limites de detecção foram 0,05 µg g⁻¹ para cada composto.

Na Tabela 3 são apresentados métodos cromatográficos assim como os métodos de extração reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em mel e em outras matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
HAMMEL <i>et al.</i> [22]	Mel	SDZ,SMR,STZ,SPD, SAD,SMZ,TAP,SME, DAP,SID,SMTX,SDM, STR,DHS,CAP,SBM, OTC,AMP,TC,SDX, SQX,DMC,CTC,NEO, PENG,SPI,DC,PEN, DES,OLE,TIL,TYL, OXA,EA,CLOX,NAF, DIC,ROXI,AMOX,SCP	HPLC-ESI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 26-61% e Limites de detecção de 31,3-49,0 µg/kg
WANG <i>et al.</i> [65]	Mel e frango	SMT, SMR e SDZ	HPLC-DAD Imunoensaio com polarização fluorescente	Foram encontradas recuperações de 86-131%. Limites de detecção de 0.9 ng g ⁻¹ 3.1 ng g ⁻¹ .
TAMOSUNAS e PADARAUSKAS [66]	Mel e ovos	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPLC-MS/MS UPLC-MS/MS LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 80-110%. Limites de decisão de 6.61-9.43 µg kg ⁻¹ and 7.25-11.9 µg kg ⁻¹ para UPLC e LC, respectivamente.
GRANJA <i>et al.</i> , [67]	Mel	STZ, SMZ E SDM	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 61.0% a 94.5%. Limites de detecção de 3 µg kg ⁻¹ , 4 µg kg ⁻¹ and 5 µg kg ⁻¹ respectivamente
ZOU <i>et al.</i> , [68]	Mel	STZ, SPD, SDZ, SMR, SMMX, SCP, SMX, SDM	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações > 70%. Limites de detecção 4 µg kg ⁻¹ .
MOHAMED <i>et al.</i> [24]	Mel	SAD,DAP,SPD,SDZ, SMTX,STZ,SMR,SMX, SMP,SME,SCP,SQX, SDX,SDT,SSZ	HPLC-APPI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,4% e Limites de quantificação de 10 µg/Kg
KOESUKWIWAT <i>et al.</i> [23]	Leite	SDZ,STZ,SMZ,SMP, SMX,SDM,CTC,TC OTC,PYR	HPLC-ESI-MS SPE	Foram encontradas recuperações de 5-166% (nos vários níveis)
SUN <i>et al.</i> [9]	Envoltório para salsicha (tripa de origem animal)	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMDZ,SMT,SMMX, SMP,SIA,SMX,SDM, SQX	HPHPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 65,2-85,9%. Limites de detecção de 0,3-0,4µg/kg e limites de quantificação de 1,5-2,2 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
LU <i>et al.</i> [25]	Carne (suína)	SDZ,STZ,SMR,SMT, SMMX,SMXZ,SQX, SDMX	HPLC-ESI-MS HPLC-APCI-MS SPME	Limites de detecção de 16-39 µg/Kg e limite de quantificação de 53-130 µg/Kg
KISHIDA [26]	Carne (bovina, aves, suína)	SDD,SDZ,SMM,SMX, SDM,SQX	HPLC-MS MSPD	Foram encontradas recuperações de 90,5-97,6% e Limites de quantificação de 0,006-0,04 µg/g
GARCÍA <i>et al.</i> [17]	Visceras de animais (rim)	SDZ,SMT,SMP,SMX SDM,SQX	HPLC-DAD LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 46-63%. Limites de decisão de 3,48-3,84 µg/Kg e Capacidade de detecção de 109,8-161,7 µg/Kg
BISWAS <i>et al.</i> [69]	Carne (búfalo)	TMP,SDD,SDX,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 75-108%. Limite de detecção de 0,031µg/g e limite de quantificação de 0,062 µg/g
FELTRIN <i>et al.</i> [10]	Leite	SDX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 76-90% e limite de detecção de 4,59µg/L e limite de quantificação de 13,9 µg/L
ZOTOU e VASILADOU. [11]	Mel	SCT,STZ,SPD,SMR SMP,SMX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 80-117% e Limites de detecção de 20-25µg/Kg
WANG <i>et al.</i> [49]	Produtos de origem animal	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPHPLC,HPCE, THPLC,ELISA, IMUNOENSAIOS LLE,SPME,SPE	Vários artigos sobre sulfonamidas em alimentos de origem animal
GALLINA <i>et al.</i> [12]	Mel	Streptomycina, Tylosin, SAD,SDZ,STZ,SMZ, SDX,SMTX,SDM	HPLC-FL LLE	Foram encontradas recuperações de 11,5-96,5%. Limites de detecção de 1,7-22ng/mL e limites de quantificação de 5,5-75 ng/mL
PECORELLI <i>et al.</i> [70]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SMMX,SCP,SMX SQX,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 62,4-85,1% e Limite de decisão 105,3-109,5 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
KISHIDA e FURUSAWA [19]	Carne (aves) e ovos	SMM,SDM,HIDRÓXI/N ⁴ -ACETIL	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 90-97% e limites de detecção de 7,2-29,8 ng/mL
LAMBA <i>et al.</i> [71]	Leite	SAD,SGN,SDZ,STZ, SMTX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 85-114%. Limites de detecção de 1,59-7,68 nmol/L e limites de quantificação de 5,3-25,59 nmol/L
PANG <i>et al.</i> , [72]	Mel	STZ, SCT, SAI, SMM, SDX,SDZ, SPD, SCP, SMTX, SMR, SMP, SDM, SMZ, SME	HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70.9-102.5%. Limites de quantificação de 1.0 and 12.0 µg/kg
POSYNIK <i>et al.</i> [73]	Carne (frango)	SDZ,SMZ,SMX,SMR, SDM,SMP	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações de 90-95%. Limites de detecção 1 ou 5 µg/Kg CCα: 103,8-127,6 µg/Kg CCβ: 115,0-137,4 µg/Kg
MAUDENS <i>et al.</i> [61]	Mel	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SME, SMT,SMP,SCP,SDX	HPLC-FL LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 37,4-66,8%. Limites de detecção de 1-2 ng/g e limites de quantificação de 2-5ng/g
PECORELLI <i>et al.</i> [18]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SQX,SDM,SCP, SMM,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 51-109% CCα: 105,2-116,2 µg/Kg CCβ: 110,9-134,9 µg/Kg
GENTILI <i>et al.</i> [60]	Carne e alimentos infantis	SID,SDZ,SPD,SMR, SMO,SMZ,SMT,SMP, SMM,SCP,SMX,SQX, SDM	HPLC-MS/MS	Foram encontradas recuperações de 70-101%. Limite de detecção de 2,6 ppb e limites de quantificação de 1,2-7,8 ppb
ZAYAS-BLANCO <i>et al.</i> [13]	Leite	SMZ	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 82,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 3µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
POSYNIAK <i>et al.</i> [74]	Mel	SCT,STZ,SMZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80%. Limites de detecção de 0,1µg/Kg e limites de quantificação de 0,2 µg/Kg
PANG <i>et al.</i> [63]	Mel	SCT,SPD,SMR,SMP, SME,SCP,SMX,SDM	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 73,5-94,1%. Limites de detecção de 0,005mg/Kg e limites de quantificação de 0,002 mg/Kg
REYBROECK [75]	Mel	Streptomycin, Tetracyclines, Cloranfenicols, SMZ, STZ,SCT	HPLC-UV	Limites de detecção para as sulfas de 25-50µg/Kg e limite de quantificação para as sulfas de 20µg/Kg
MARTEL e ZEGGANE [62]	Mel	STZ, SMZ	HPLC-FL IMUNOENSAIO DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 2µg/Kg
FURUSAWA [21]	Leite	OTC,SDD	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 88,8-93,1%. Limites de quantificação 0,044 µg/mL (OTC) e 0,023 µg/mL(SDD)
POSYNIAK <i>et al.</i> [76]	Mel	SCT,SMT,STZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80,9-83,4%. Limite de detecção de 0,1-0,5µg/Kg
HELLER <i>et al.</i> [77]	Ovos	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SMZ, SMT,S P,SCP,SMX, SMMX,SIA,SDM,SQX	HPLC-MS-MS HPLC-UV LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 51-103%
FURUSAWA [14]	Leite	SMZ,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 81-94%. Limites de detecção de 5-10ng/mL e limites de quantificação de 3-5ng/mL

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
STOEV e MICHAILOVA [78]	Produtos de origem animal	SAD,SDZ,SMR,SDD, SMP,SOX,SMX,SDM, SQX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 64-75% e Limites de detecção de 0,5-1,0 µg/g
ITO <i>et al.</i> [79]	Visceras de animais (rins e fígado)	SDZ,SMR,SDD,SMP, SAI,SMMX,SMTX, SDM,SQX	HPLC-UV HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70,8-98,2% e Limites de detecção de 0,03 µg/g
FURUSAWA [80]	Leite	SMZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações maiores que 83% e Limites de detecção de 4 µg/kg
HEERING <i>et al.</i> [81]	Mel	TC, Streptomycin, STZ	Imunoensaio - EIA	Foram encontradas recuperações de 100-105%. Limites de detecção de 50 µg/g
GEHRING <i>et al.</i> [82]	Salmão	SDZ	HPLC-API/MS	Foram encontradas recuperações de 59,2-78,3%. Limite de detecção de 0,2 ng/g e limite de quantificação de 1,0 ng/g
CANNAVAN <i>et al.</i> [83]	Carne	SMT	CG-MS SPE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 86-114% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
VIÑAS <i>et al.</i> [84]	Leite	SA,SGN,SDZ,SPD,SMX	HPLC-FL LLE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 82-104% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
HORIE <i>et al.</i> [64]	Mel	STZ,SDZ,SMR,SMP, SDD,SMMX,SCP, SMX,SQX,SDM	HPLC-DAD SEM EXTRAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 62,1-90,2%. Limites de detecção de 0,8µg/g
AGARWAL [15]	Leite	SDZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 83-88%
PATHY [85]	Carne	SQX	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 77-85%

3.1 PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise de quantidades muito pequenas (traços) de contaminantes em matrizes complexas como alimentos frequentemente requerem inúmeras etapas de preparação e extração de amostras antes das técnicas de análises instrumentais (detecção e quantificação). Dentre as várias etapas envolvidas na preparação de amostras, alguns passos são mais comuns, tais como amostragem (homogeneização), extração, *clean-up* (eliminação de interferentes), separação e concentração, detecção e quantificação dos analitos [86].

Técnicas, como a cromatografia a líquido, requerem uma etapa de preparo da amostra antes da análise, de forma a minimizar erros na análise e evitar danos nas colunas cromatográficas [87].

Atualmente existem vários métodos para o preparo de amostras, com inúmeras possibilidades, vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método quando se trabalha com matrizes complexas, como alimentos, exigem que o analista tenha o conhecimento tanto da matriz com a qual se está trabalhando assim como da técnica instrumental que será utilizada posteriormente para a detecção/quantificação do composto, a fim de evitar, principalmente, que interferentes possam ser co-eluídos juntamente com os analitos de interesse e efeitos de matriz sejam incluídos nos resultados [88].

Segundo Queiroz, Collins e Jardim [89], as técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo do analista gasto durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras em determinado tempo.

Dentre as técnicas de extração mais comumente utilizadas para concentrar analitos em mel pode-se destacar a extração em fase sólida (EFS) [11; 63; 72; 73 e 74], extração líquido-líquido (LLE) seguida de EFS [61], e extração líquido-líquido [12 e 22].

3.1.1 Extração por Fase Sólida (EFS)

A extração por fase sólida é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [88]. O método de extração por fase sólida foi desenvolvido na década de 70, visando resolver algumas desvantagens da extração líquido-líquido e otimizar rotinas [90].

É uma técnica que consiste na separação líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica, através da qual a solubilidade de interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição [88; 91]. Através de forças intermoleculares, do tipo das de Van der Waals ou dipolo-dipolo, entre o analito e a superfície adsorvente da fase sólida ocorre o mecanismo de retenção e eluição dos analitos. Dependendo do grau de afinidade do analito com o solvente de eluição, este terá maior ou menor retenção [88].

A extração por fase sólida tem vários objetivos [87], sendo eles:

- (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;
- (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes;
- (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito; e
- (d) estocagem da amostra, muito usada para evitar o transporte de grandes volumes das mesmas.

Existem dois tipos de sistemas de extração por fase sólida: em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema em linha, a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. No sistema fora de linha (*off-line*), a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor [91]. Nesta pesquisa, utilizou-se o método de extração em fase sólido com sistema off-line.

Na prática, para uma extração por fase sólida são utilizados tubos de polipropileno no formato de seringa, contendo a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia), usualmente denominada cartucho de extração [88], conforme mostrado na Figura 6.

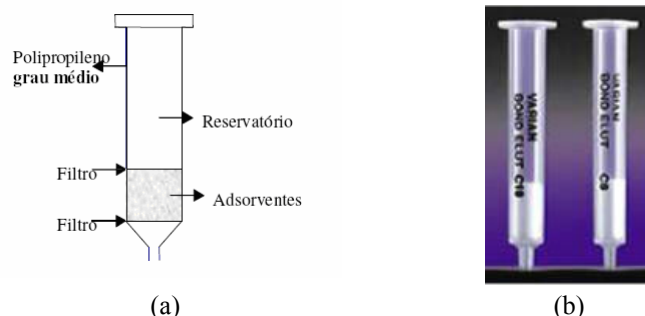


Figura 6 – (a) Esquema de cartucho para extração EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.
Fonte: (a) [88]

O atual estágio de desenvolvimento da extração em fase sólida deve-se em grande parte às descobertas de novos adsorventes [89]. No Quadro 2 são apresentados os principais tipos de adsorventes utilizados em extração em fase sólida.

Quadro 2 - Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.

Não-polares	Polares	Troca Iônica
Octadecilsilano – C18	Florisil – FL	Benzenossulfonilpropilsilano – SCX
Octilsilano – C8	Alumina – Al	Sulfonilpropilsilano – PRS
Etilsilano – C2	Sílica – Si	Carboximetilsilano – CBA
Metilsilano – C1	Cianopropilsilano – CN	Dietilaminopropilsilano – DEA
Fenilsilano – PH	Diolsilano – 2OH	Trimetilaminopropilsilano – SAX
Cicloexilsilano – CH	Aminopropilsilano – NH ₂	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA
	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA	
	Poliméricas (Nexus)	

Fonte: adaptada de [91]

Recentemente, alguns estudos visando desenvolver fases de EFS com aplicações mais específicas têm sido desenvolvidos. As fases poliméricas são exemplos típicos destas fases, as quais possuem maior capacidade de retenção que as de sílica, tendo seletividade usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel [93].

Na Figura 7 é apresentado um esquema do procedimento de extração em fase sólida. Na etapa A, ocorre a ativação e condicionamento do cartucho; na etapa B, ocorre a aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; na etapa C, ocorre a troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*) e, por último, na etapa D ocorre a troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

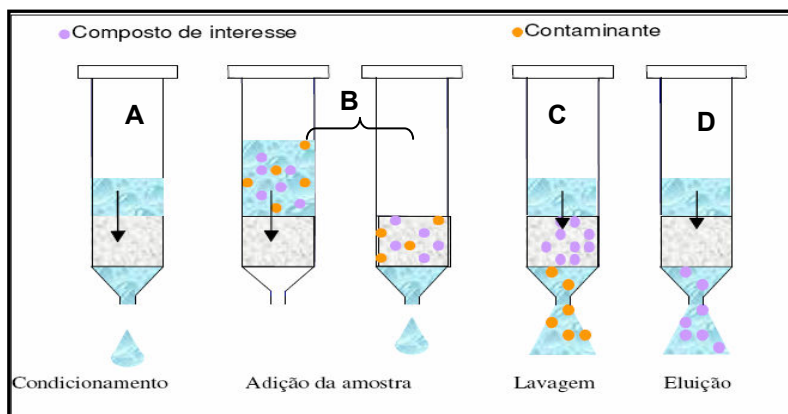
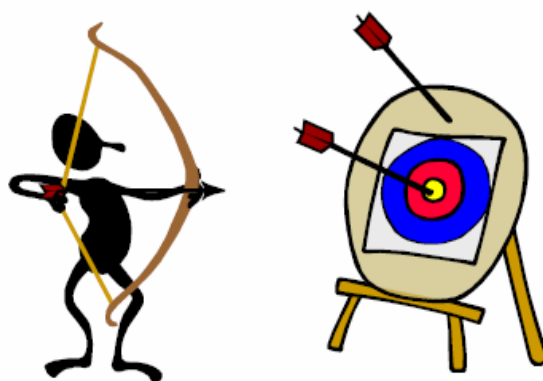


Figura 7 - Principais etapas empregadas em extração por fase sólida (EFS).

Fonte: [87]

Na prática, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com um pequeno vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Após a drenagem de toda a fase líquida, os analitos de interesse ficarão retidos na fase sólida do cartucho. O analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito pré-concentrado, ou seja, com a concentração apropriada para a análise [88].

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO



4.VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nenhuma análise química, automatizada ou manual, fornece resultados isentos de erro. Geralmente, os resultados são reportados em forma de valores numéricos que contêm informações que devem ser corretamente interpretadas e avaliadas, de acordo com as especificações do método e as necessidades de cada usuário do mesmo resultado [93]. Neste contexto, dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico, ou mesmo a adaptação de um método já existente, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [94].

Segundo o INMETRO [95], a validação de um método de ensaio é a denominação que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida. O processo de validação de métodos analíticos desenvolvidos em laboratórios é efetuado após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos. Para Barros [96] a validação do método analítico permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [97] e que envolve várias etapas. A NBR/ISO IEC 17025 [98] define que um processo de validação deve incluir a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método. Todo processo de validação deve ser abrangente o suficiente, de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos [97].

Existem vários órgãos internacionais responsáveis por processos de validação, que estabelecem muitos conceitos e procedimentos sobre este processo, gerando um grande volume de informações. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os responsáveis por processos de validação. Estes órgãos disponibilizam guias, diretrizes ou mesmo normas, para o procedimento de validação de métodos analíticos.

No Quadro 3 são apresentados os principais critérios utilizados para a validação de métodos segundo os mais reconhecidos órgãos de regulamentação, nacionais e internacionais.

Quadro 3 - Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO	ICH	USP	IUPAC
Especificidade/Seletividade	x	x	x	x	x ¹
Faixa de trabalho e Faixa linear	x	x	x	x	x
Linearidade	x	x	x	x	x ¹
Limite de Detecção	x	x	x	x	x
Limite de Quantificação	x	x	x	x	x
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	-	-	-	x
Exatidão e tendência	x ¹	x	x ¹	x ¹	x
Precisão (repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade)	x ²	x	x ¹	x ¹	x
Robustez	x	x	x	x	x
Incerteza de medição	-	x	-	-	x

¹ - Realiza calibração; ² - Não realiza tendência

Os principais parâmetros utilizados para a validação de métodos cromatográficos são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez [97]. A Figura 8 mostra um fluxograma com as etapas do procedimento analítico para a validação do método para análise de resíduos de sulfonamidas em mel proposto neste trabalho.

4.1 FAIXA DE APLICAÇÃO

A faixa de aplicação de um método refere-se ao intervalo entre a concentração superior e inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade [99].

Na prática a faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, e é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão [99].

Segundo Thompson *et al.* [100], a IUPAC estabelece duas faixas de aplicação, uma para impurezas (0-150%) e outra para macro-componentes (50-150%), sendo que o valor esperado deve estar contido dentro de uma destas duas faixas. A AOAC [101] recomenda que, para análise de traços, a faixa seja compreendida entre o limite de quantificação e duas ou três vezes o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Na análise de fármacos, a ANVISA indica uma faixa de aplicação entre 80-120% da concentração teórica do analito, e recomenda que seja determinado intervalo linear de, no mínimo, 5 níveis de concentração diferentes [102].

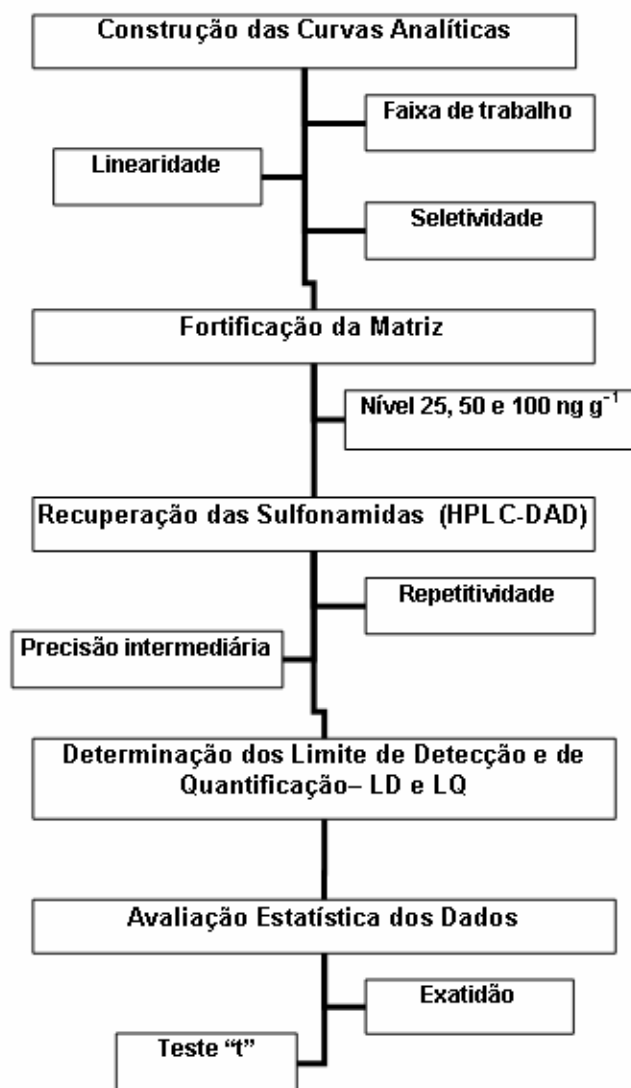


Figura 8 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação [97].

A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico [103]. Na maior parte das vezes uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito deve ser determinada empiricamente e pode ser representada como uma equação de reta, geralmente chamada de curva analítica ou gráfica de calibração, que representa a resposta de um método analítico como função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido [104].

Segundo Hubert *et al.* [105] uma outra forma de se avaliar a linearidade é por meio da relação entre concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear.

Em geral recomenda-se que o coeficiente de correlação seja maior que 0,990, sendo considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a regressão [95]. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [97].

4.3 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método analítico determinar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz [103]. A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da matriz, tais como, impurezas, ingredientes ativos, excipientes, e outros compostos de formas similares que possam estar presentes [106].

A seletividade é um parâmetro muito importante quando se trabalha com análises de multiresíduos. Deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, não sendo um parâmetro a ser realizado uma única vez, e sua realização deve ocorrer de forma contínua. Conhecer os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a análise ajuda na escolha das melhores condições para detecção. É através da seletividade que se garante que o pico cromatográfico seja o do composto em estudo [97].

4.4 PRECISÃO

A precisão refere-se à proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas [99]. Pode ser expressa pelo desvio dos resultados em relação à sua média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV) [97], conforme apresentado na equação 1.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{X}$ = média das recuperações.

Em análises de traços são aceitos valores de RSD de até 20%, já para métodos que quantificam compostos em macro-quantidades, o RSD deve ser de 1 a 2%. A precisão também pode ser melhorada através de um maior número de replicatas [107].

Comumente, a precisão de um método analítico em validação de métodos pode ser expressa como repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade [100].

4.4.1 Repetitividade

A repetitividade (ou repetibilidade) refere-se à precisão entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições, equipamentos, analistas, em um curto intervalo de tempo [99]. O INMETRO [95] recomenda sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r').

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo a mais aconselhável de ser adotada. Tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente os resultados não tenham diferença [99; 97]. O número de ensaios para a precisão intermediária segue a mesma recomendação que para a repetitividade segundo INMETRO [95].

4.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, ou seja, em localidades diferentes, utilizando um mesmo conjunto de amostras [103]. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratoriais), e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em legislações, ou farmacopéias etc... [97].

4.5 EXATIDÃO

A exatidão é estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [103]. Sempre se considera a exatidão dentro de certos limites, a um dado nível de confiança [97]. Para a ANVISA [58] e o ICH [99] é necessário um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração.

Os procedimentos mais recomendados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do analito. Para a análise de matrizes biológicas, como alimentos, os ensaios de recuperação são os mais utilizados [97; 103].

4.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação pode ser definido como a quantidade de analito presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada [100]. A recuperação está relacionada com a exatidão, porque reflete a quantidade de determinada substância recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra [103].

Na prática, o estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, também sendo denominada de fortificação. A equação 2 apresenta a relação utilizada para os cálculos da percentagem de recuperação.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

Na Figura 9 é mostrado o esquema proposto por Brito [108] para representar o processo de fortificação.

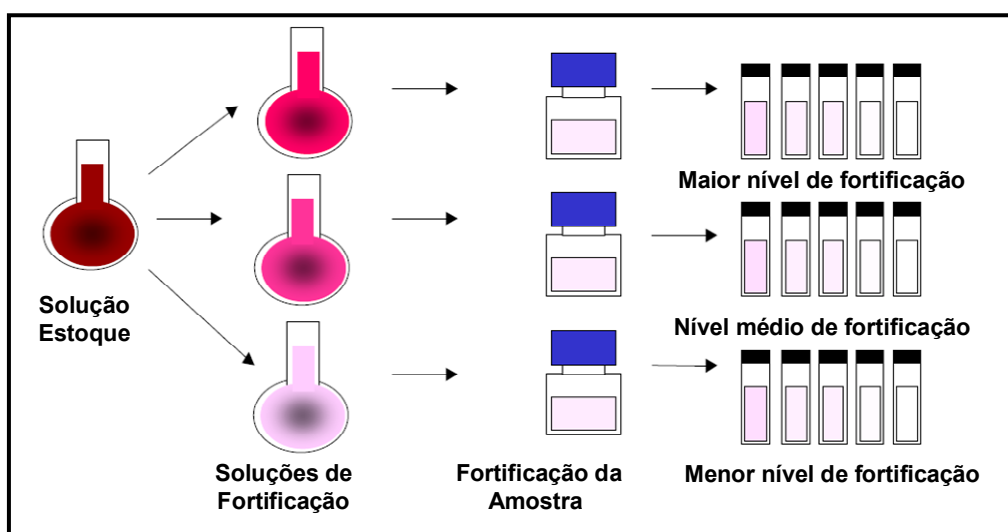


Figura 9 - Processo de fortificação das amostras.
Fonte: [108]

A limitação do procedimento de recuperação baseia-se no fato de que a substância adicionada não se apresenta na mesma forma que a encontrada originalmente na amostra, devendo-se ter o cuidado de reproduzir ao máximo as condições originais da amostra. Outro fator limitante para os ensaios de recuperação é o efeito da matriz, uma vez que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, sendo necessário investigar e eliminar estes efeitos dos interferentes [104].

Para garantir que os resultados sejam confiáveis é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, devendo-se avaliá-la na faixa de concentração esperada do composto de interesse [97].

Segundo a Comunidade Européia [109] os intervalos aceitáveis para recuperação em análises de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Contudo, em função da complexidade da composição da amostra esta faixa de variação pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 35\%$.

No estudo de recuperação também são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de *Student* de acordo com a equação 3. Se o valor “t” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato.

$$t_{calc} = \frac{(Rec - 100)}{s_{rec} / \sqrt{(n-1)}} \quad (3)$$

Onde: Rec é a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 é a recuperação percentual desejada; n é o número de determinações (em geral, um mínimo de 5 repetições); s_{rec} é o desvio padrão nas recuperações.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual para a determinação do limite de detecção, pelo método da relação sinal/ruído e por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica [97].

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração detectável em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas; S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*).

4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas [97]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [103].

A determinação do valor do limite de quantificação do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a validação dos resultados, tornando o método menos preciso [110]. Concentrações maiores para o limite de quantificação deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão [96].

O limite de quantificação também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o limite de detecção, sendo que para o limite de quantificação a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e, a equação utilizada é demonstrada na equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

5. MATERIAIS E MÉTODO



5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do método para a determinação de sulfonamidas em amostras de mel cinco etapas foram planejadas. A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a revisão bibliográfica sobre a ocorrência de sulfonamidas em alimentos e mel de forma a reunir dados científicos e literatura para oferecer suporte no desenvolvimento do método. A segunda etapa consistiu no estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas para a análise quantitativa. Uma vez otimizados os parâmetros cromatográficos estes foram fixados e em seguida foram obtidas curvas analíticas dos compostos. Na terceira etapa foi feito um estudo de pré-tratamento da amostra utilizando hidrólise ácida e também foram estabelecidas e otimizadas as condições de extração em fase sólida. As amostras usadas nesta etapa foram às coletadas na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA. Na quarta etapa procedeu-se à validação do método proposto. A última etapa foi realizada pela aplicação do método, utilizando-se amostras de méis comerciais coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins.

5.1.1 Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas

As amostras de mel foram coletadas no apiário Turimel, localizado na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA que está localizada na região do Alto Turu, no estado do Maranhão, às margens da BR 316. A área total do município é de 904, 95 km², localizando-se próximo à fronteira do Estado do Pará, a 420 quilômetros da capital do Maranhão, São Luís.

Segundo apicultores do local a flora comumente visitada pelas abelhas da região inclui as seguintes plantas (nomes populares): chanana, assa-peixe, vassourinha de botão, hortelãzinho, bamburral, juçara, embaúba, maria-mole, cajueiro, laranjeira e seringueira.



Figura 10 – Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.
Fonte: adaptado de [111]

A coleta das amostras para o desenvolvimento do método foi realizada no mês de setembro de 2007. O critério estabelecido para a coleta das amostras a serem utilizadas para o desenvolvimento do método foi a ausência de resíduos de fármacos e outros resíduos de contaminantes. Optou-se por fazer a coleta neste apiário após análise do histórico produtivo do apiário, onde se evidenciou a preocupação com a qualidade do produto. O apiário, atualmente, está buscando certificação orgânica, fato este que serve como indício de que o mel produzido neste apiário seja livre de resíduos de contaminantes.

Foram coletados 30 kg de mel e estes foram armazenadas em frascos de vidro envoltos por papel alumínio a fim de evitar degradação de alguns compostos por ação da luz. Outro cuidado tomado com as amostras foi manter uma vedação dos frascos eficiente, visando impedir a entrada de ar e início de possíveis processos fermentativos. As amostras foram conservadas a temperatura ambiente.

Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para o início das atividades de pesquisa.



Figura 11 - (a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.

5.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram:

5.2.1 Padrões

- Sulfadiazina (SDZ) – Sigma Aldrich, com pureza de $\geq 99\%$;
- Sulfadimetoxina (SDM) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%;
- Sulfadimidina (SDD) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%;
- Sulfatiazol (STZ) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%.

5.2.2 Reagentes e Solventes

- Metanol (HPLC solvent Merck-Germany);
- Acetonitrila (HPLC solvent Merck-Germany);
- Água ultra pura (Milli-Q), sistema Millipore;
- Acetato de Sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) M.M. 136,09 - Merck-Germany ;
- Ácido Acético Glacial P.A. (CH_3COOH)- M.M 60,05 - Merck-Germany.

5.2.3 Dispositivos para Extração por Fase Sólida

- Octadecil silano (C_{18}): cartucho - C_{18} – 500 mg/6mL – AccuBON^{II}ODS – Agilent Technologies;

- Octil silano (C₈): cartucho - Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- Cartucho: ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian.

5.2.4 Coluna Cromatográfica

- Coluna cromatográfica analítica - Phenomenex – 150mm x 4,0 µm d.i, recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica.
- Coluna de Guarda para coluna C-18 – Phenomenex, KJ0-4282.
- Coluna cromatográfica analítica C₈ - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb-Varian.

5.2.5 Equipamentos

- Balança eletrônica, modelo Bel Mark 210A, faixa de pesagem de 10mg-210g – Bell Engineering, Italy;
- Banho ultra-som USC 1450 – Unique Thorton, Brasil;
- Bomba de vácuo – Marconi, modelo MA058, Brasil;
- Cromatógrafo a Líquido marca Varian (EUA), composto por:
 - Bombas de alta pressão - binária - Varian Polaris ProStar 210/210;
 - Injetor manual, loop 20µL - Rheodyne;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, Varian Polaris ProStar 335 – Varian (EUA);
 - Computador Digital, Intel Core 2, 2,4 GHz, HD 160 Gb, com impressora HP Deskjet D 4160;
- Deionizador de água – Milli-Q Academic System – A10, sistema Millipore (EUA);
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian (EUA);
- Rotaevaporador – Fisatom – Brasil, modelo 802;
- pHmetro Hanna Instruments, com eletrodo de pH HI 1110B (vidro combinado) modelo pH 21, Brasil;

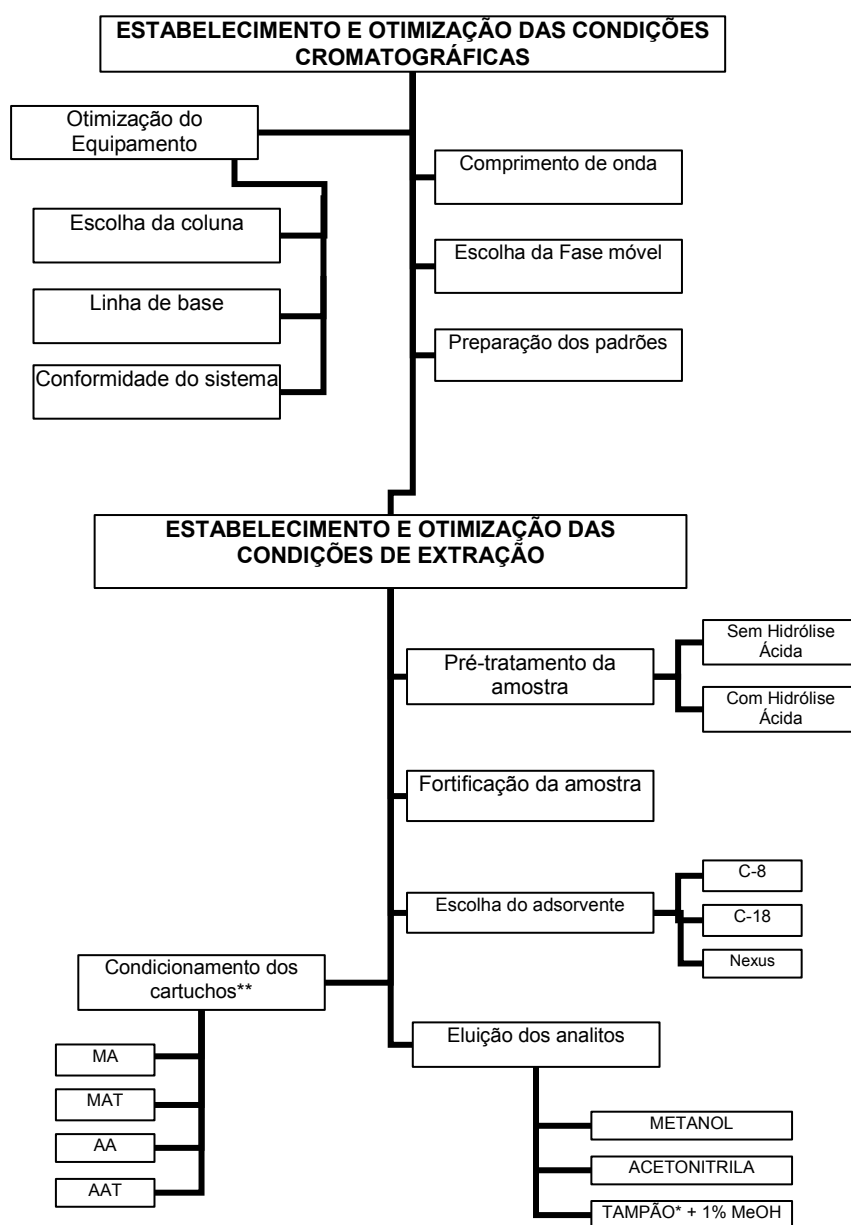
5.2.6 Outros materiais

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0 e 1000,0 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 10 e 100 mL;
- Espátula de aço inox;
- Membrana Acetato de celulose, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - SartoriusMerck;
- Membrana de Vidro, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - Merck
- Detergente Extran – Merck;
- Outros materiais de laboratório (Becker, proveta, micro pipetadores (100-1000 µL e 10-100 µL), funil de separação, pipeta, pipeta de *Pasteur*);
- Sistema de extração a vácuo (*manifold*), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (EUA).
- Gás nitrogênio (N₂) – *White Martins* (Brasil);

5.3 MÉTODO

Os métodos de análises de resíduos de sulfonamidas são desenvolvidos para atender as análises de analitos individuais e análise simultânea de vários resíduos, denominadas “análise multiresíduo”. O desenvolvimento de métodos multiresiduais, em geral, são muito trabalhosos, uma vez que são determinados analitos com características diferentes sofrendo também interferência dos constituintes da matriz que normalmente interferem na análise.

A Figura 12 mostra um fluxograma com a visão geral das etapas do procedimento analítico para o estabelecimento das condições cromatográficas e condições para as extrações.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

** MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.

Figura 12 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.

5.3.1 Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas

A primeira etapa para o estabelecimento das condições cromatográficas consistiu na otimização do equipamento, onde foram realizados os experimentos para escolha da coluna, linha de base e conformidade do sistema (de acordo com os critérios citados por SHABIR,

[113]). O estudo das condições cromatográficas compreendeu seleção do comprimento de onda, escolha da composição da fase móvel e solvente para preparação das soluções-padrão.

5.3.1.1 Seleção da coluna

Para a análise das sulfonamidas foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octilsilano C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb -Varian) e a outra contendo uma fase estacionária octadecilsilano C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm - Phenomenex).

5.3.1.2 Linha de Base do Solvente

É o sinal obtido pelo sistema cromatográfico detector DAD, mais a coluna utilizada com a injeção do solvente. O sinal da linha de base foi obtido injetando-se 20 µL de metanol, um dos solventes a ser utilizado nos procedimentos de desenvolvimento e validação do método. Este teste também forneceu informações sobre o grau de pureza do mesmo, que deve ser grau resíduo (CLAE), necessário para análise de traços de fármacos, com um mínimo de impurezas possível.

5.3.1.3 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada na etapa de otimização do equipamento, assim como no desenvolvimento e validação do método. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção (k'), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critérios de aceitação foram utilizados os parâmetros recomendados por Shabir [113], conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Limites
Fator de retenção (k')	$1 < k' < 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$
Número de pratos teóricos da coluna sendo usada (N)	$N/m > 8000$

Fonte: adaptado de [113].

5.3.1.4 Seleção do Comprimento de onda

Foram realizados dois testes para obtenção dos espectros de absorção, um utilizando espectrofotômetro modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) e outro usando o próprio detector do cromatógrafo (ProStar 335 - Varian). Os espectros de absorção obtidos no espectrofotômetro corresponderam a uma varredura de 190 a 300 nm e a varredura feita no detector do cromatógrafo correspondeu a 250 a 280 nm. O comprimento de onda correspondente à absorbância média dos analitos foi posteriormente utilizado para a determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos.

5.3.1.5 Seleção da fase móvel

Para a análise cromatográfica (CLAE) dos analitos foram testados seis tipos de fases móveis, no modo gradiente.

O preparo dos solventes para a fase móvel consistiu na filtração em kit para filtração com membrana de porosidade 0,45 µm para solventes, orgânicos e água, e desgaseificação em banho ultra-som por 20 minutos para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em garrafas próprias para solventes e foram rotuladas com informações a respeito da sua composição e o valor do pH. Antes do início dos trabalhos as soluções permaneceram no banho ultra-som por 10 minutos para a retirada de gases dissolvidos.

5.3.1.6 Preparação dos padrões

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas, individualmente, pela dissolução dos padrões em metanol. Pesou-se em balança analítica 0,0010g da sulfonamida e solubilizou-se cada uma em metanol, completando-se o balão para 0,01 L de solução. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar rotulado e com tampa de rosca para ser estocado. As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4°C, para evitar degradação dos padrões.

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o teste a ser realizado. Foram utilizados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho: solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 4,5 e solução aquosa de ácido acético 0,1%. As soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações e usadas para fortificação das amostras e para preparo das soluções padrão em extrato para os testes de recuperação e linearidade.

Os padrões foram injetados individualmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após conhecido o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos (solução contendo uma mistura dos quatro padrões – solução mix, a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

5.3.2 Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração

Os métodos de análises cromatográficas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. A etapa de extração em geral é o ponto crítico da análise, por ser responsável por erros nos resultados. As etapas de estabelecimento e otimização das condições de extração consistiram no pré-tratamento da amostra (hidrólise ácida), escolha do adsorvente (C8, C18 e Nexus), condicionamento dos cartuchos (metanol:água; metanol:água:tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5); acetonitrila:água; acetonitrila:água: tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5) e escolha do solvente para eluição (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 com adição de 1% de metanol).

5.3.2.1 Pré-tratamento da amostra

O mel é uma amostra complexa composta por várias substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes. Para diminuir o efeito da matriz na análise cromatográfica alguns trabalhos na literatura sugerem uma etapa de hidrólise ácida antes da extração a fim de romper possíveis ligações de interferentes com os analitos de interesse.

No presente trabalho, foram realizados vários testes para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. A massa de mel foi fixada em 1,0 g, de forma a diminuir o número de variáveis a serem testadas. Os parâmetros estudados

foram: concentração do ácido, volume de ácido a adicionar, tempo de hidrólise e forma de agitação. Na Tabela 5 são apresentados os testes realizados.

Tabela 5 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

A etapa de hidrólise ácida propriamente dita consistiu na adição de um volume de ácido em 1,0 g de mel. A solução de mel (extrato) foi levada para agitação por um determinado tempo. Após a hidrólise ácida os extratos hidrolisados de mel tiveram seu pH ajustado para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e solução tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5. Os extratos de mel após ajuste do pH foram filtrados em membrana de filtração (membrana de acetato de celulose) para retirada de quaisquer partículas que possam estar presentes no extrato.

5.3.2.2 Seleção do adsorvente

Visando obter uma melhor recuperação do analito, três adsorventes foram avaliados, sendo eles:

- EFS Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- EFS ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian;
- EFS C₁₈ – 500 mg/6mL – AccuBOND^{II} ODS – Agilent Technologies.

5.3.2.3 Condicionamento dos cartuchos

Os solventes testados para o condicionamento do cartucho e suas proporções foram:

metanol:água (1:1); metanol:água:tampão (1:1:1); acetonitrila:água (1:1); e acetonitrila:água:tampão (1:1:1).

5.3.2.4 Eluição dos analitos

Para verificar a melhor condição de extração das sulfonamidas foram testados três solventes para eluição, sendo eles: metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5 com adição de 1% metanol.

5.3.2.5 Extração por EFS

A fortificação das amostras para os estudos de extração consistiu na adição de volumes de solução padrão dos analitos no mel, de forma que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 µL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L⁻¹.

Os cálculos realizados foram realizados do seguinte modo: para se obter a concentração de 0,10 mg L⁻¹ das quatro sulfonamidas em 1000 µL de solução final, por exemplo, necessita-se de $10 \times 10^{-3} \text{ mg}$ $\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1} \right)$.

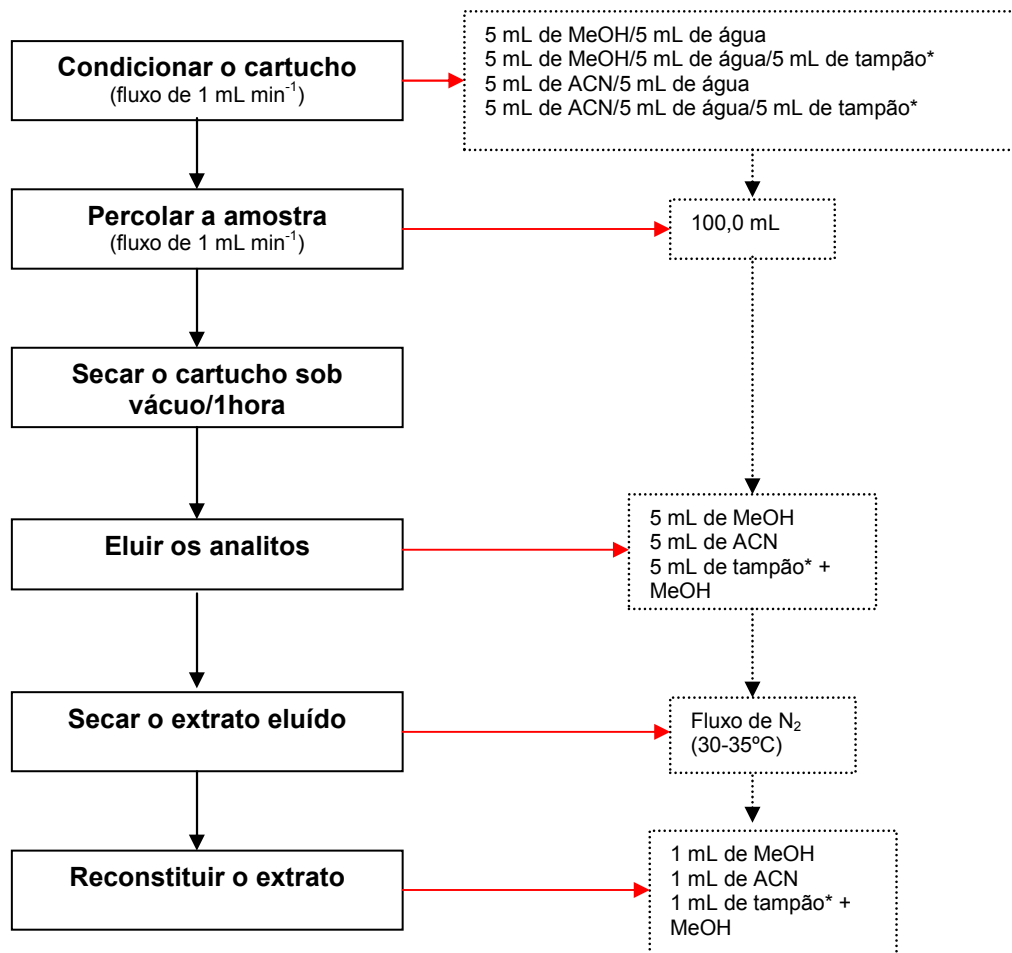
Como foi percolado um volume de 100,0 mL de extrato de mel hidrolisado enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 0,10 mg L⁻¹

$\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow C = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ mg}}{100 \times 10^{-3} \text{ L}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \right)$. Partindo-se de uma solução estoque de 1,0 mg L⁻¹,

o volume da solução padrão mista a ser adicionado no extrato de mel é de 10 mL $\left(C_{\text{padrão}} \cdot V_{\text{padrão}} = C_{\text{amostra}} \cdot V_{\text{amostra}} \rightarrow 1,0 \text{ mg L}^{-1} \times V_{\text{padrão}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 100 \text{ mL} \rightarrow V_{\text{padrão}} = 10 \text{ mL} \right)$.

Para a extração das amostras, testemunha e fortificada, foram realizadas utilizando-se sistema de extração (Manifold) sob vácuo. Antes da percolagem da amostra através do cartucho este foi condicionado com solventes, vazão de fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0 mL da amostra (fluxo de 1 mL min⁻¹), os cartuchos foram secos sob vácuo por 45 minutos. Procedeu-se a eluição dos analitos com 5 mL de solvente, em seguida os analitos eluídos foram secos sob N₂ a temperatura ambiente e posteriormente retomados com 1000 µL de solvente. Os extratos foram em seguida injetados para análise cromatográfica.

A Figura 13 mostra um esquema com as etapas do procedimento analítico para os testes de extração para determinação de sulfonamidas em mel.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

Figura 13 - Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração EFS.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA [60] e Comunidade

Européia (*EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE*) [109] para análise de resíduos em alimentos.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se testes em quintuplicata, de padrões e amostras testemunhas, com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada sulfonamida.

5.4.2 Linearidade

A região linear de resposta do detector foi determinada através de cálculo de regressão linear da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções-padrão assim como com amostras testemunhas fortificadas nas mesmas concentrações que as soluções-padrão. As soluções foram preparadas a partir de uma solução intermediária de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram injetadas cinco vezes. As concentrações utilizadas para o estudo das sulfonamidas foram: 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa linear de trabalho). Construiu-se o gráfico de calibração para os compostos estudados, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo x e os valores das áreas dos picos no eixo y.

A linearidade e a sensibilidade do método foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica. A linearidade foi expressa como o coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

5.4.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O Limite de detecção (LD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas. Para isso, foram estabelecidas as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. O Limite de quantificação (LQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas.

Determinou-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse para calcular os limites de detecção e de quantificação.

5.4.4 Estudo de recuperação

Os estudos de recuperação foram utilizados para avaliar o método quanto à precisão e exatidão; este foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 5.5).

O procedimento experimental consistiu da adição de volumes da solução padrão no mel, para que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 μL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L^{-1} .

5.4.4.1 Precisão

Foram realizados dois testes quanto à precisão do método. Verificou-se a precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de duas amostras de mel fortificadas a concentração de 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, os testes foram realizados em quintuplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Já a precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de duas amostras de mel em 3 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 25, 50 e 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

5.4.4.2 Exatidão

Os resultados e as conclusões com os dados obtidos do método analítico foram submetidos à avaliação estatística, e a expressão dos resultados foi apresentada em um determinado intervalo de confiança relacionado com os valores de exatidão e precisão dos resultados. Aplicou-se o teste “t” de *Student* nos resultados.

5.5 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras comerciais de mel, coletadas no Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (estados vizinhos ao Maranhão). Na Figura 14 é apresentado um esquema com o método proposto para a determinação de sulfonamidas em mel.

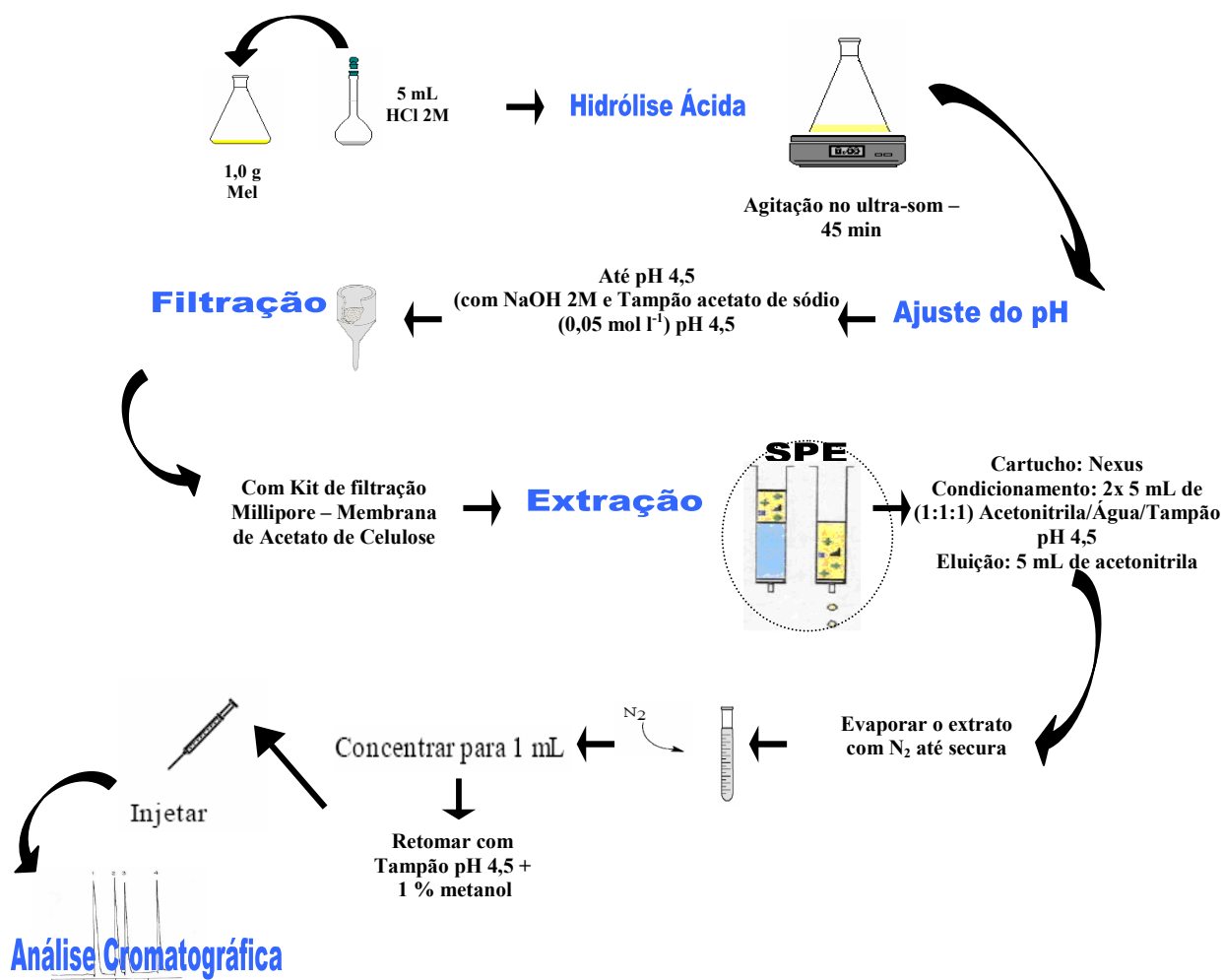


Figura 14 - Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por ZOTOU e VASILIAOUDOU [11] para a determinação de sulfonamidas em mel por HPLC-DAD que emprega solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6; como fase estacionária a coluna C18 e fase móvel: metanol e solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6, com adição de 1% de ácido acético, no modo isocrático. Os autores realizaram testes de extração em fase sólida com vários cartuchos e solventes para eluição. Para a etapa de extração foi utilizado o método recomendado por MAUDENS *et al.* [63] como referência inicial, que utilizou hidrólise ácida com ácido clorídrico 2M e extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C18.

6.1 SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Na Tabela 6 são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 300 nm para as sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram posteriormente selecionados na determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos. Os testes foram realizados com as sulfonamidas com concentração em 1 mg L⁻¹ em metanol.

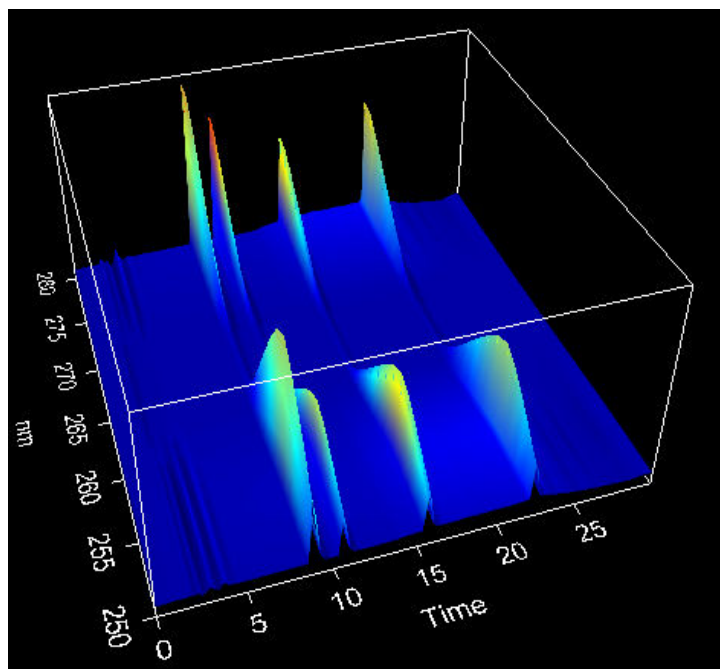
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.

Composto	λ máx (nm)
Sulfadiazina	270
Sulfadimetoxina	272
Sulfadimidina	269
Sulfatiazol	260

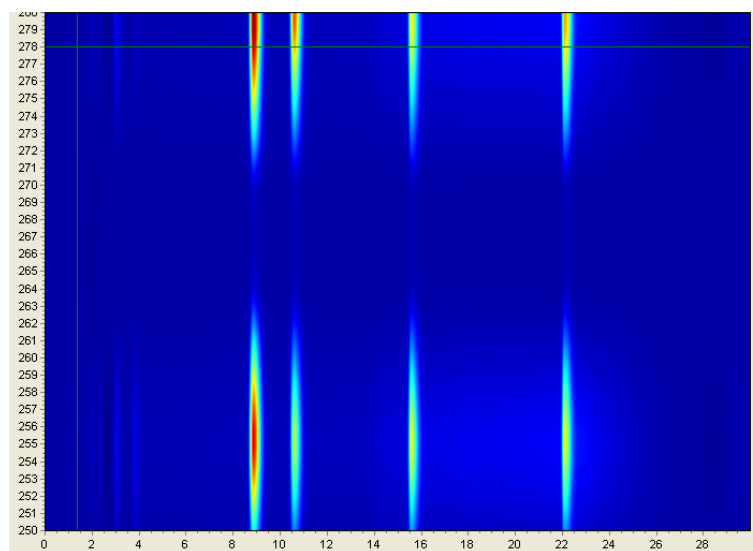
Nas Figuras 15 (a e b) e 16 (a e b) são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção na região do UV (250-280 nm) e os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda na região UV em estudo.

Os resultados encontrados em ambos os equipamentos confirmam o comprimento de onda de máxima absorção, 278 nm, para a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e

sulfadimetoxina. Para sulfatiazol, embora a máxima absorção não ocorra em 278 nm, resultados satisfatórios foram obtidos neste comprimento de onda, justificando a escolha deste comprimento de onda para os quatro compostos em estudo.

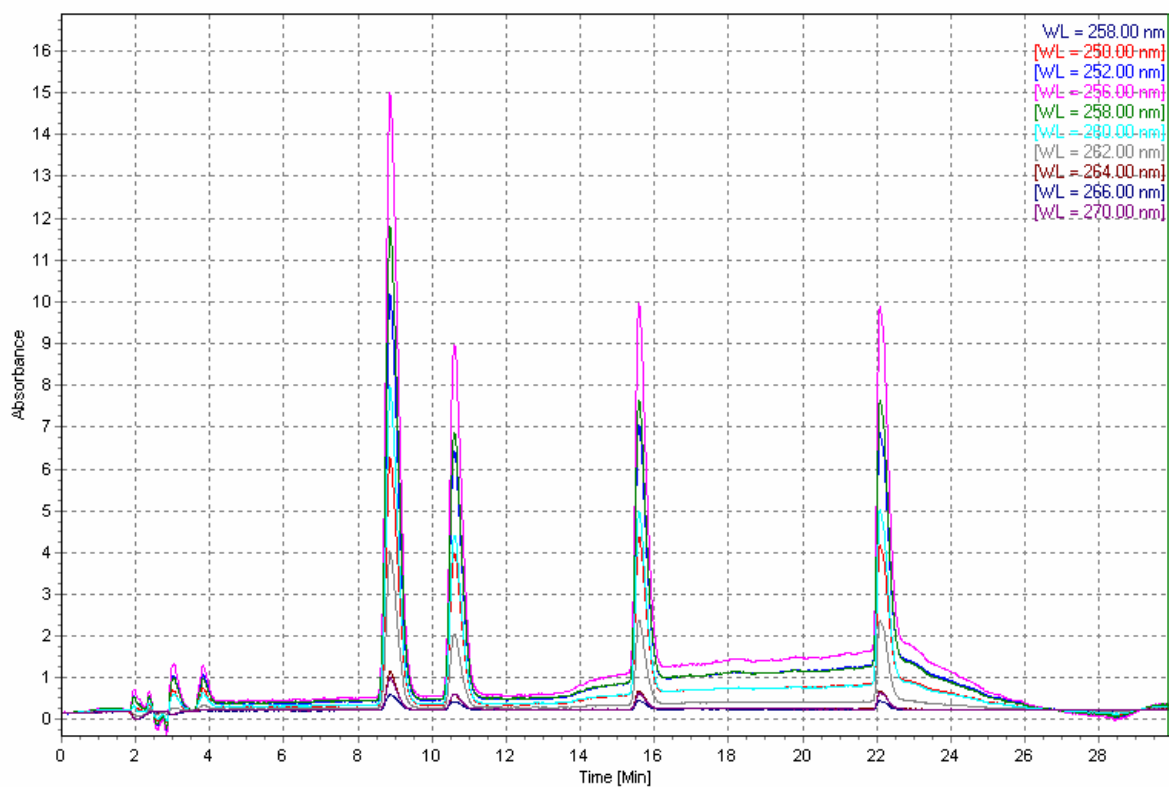


(a)

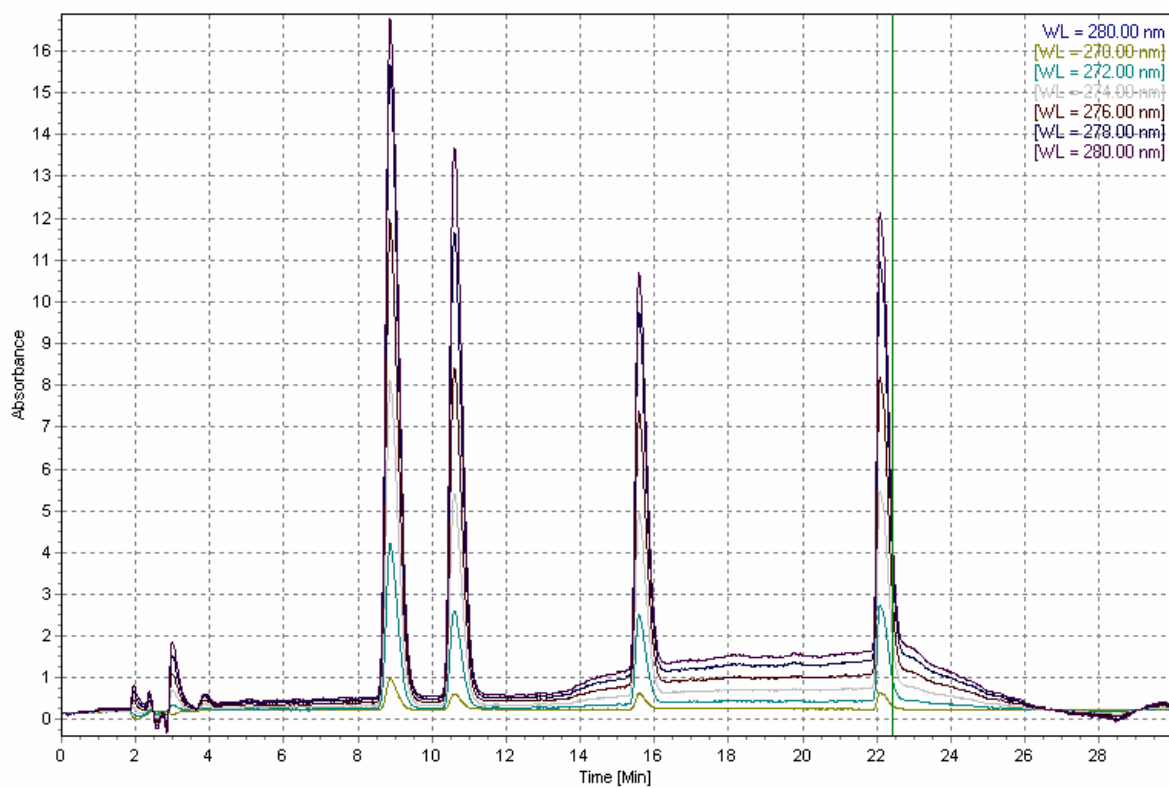


(b)

Figura 15 - Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.



(a)



(b)

Figura 16 - Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatográfico: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm

6.2 SELEÇÃO DA COLUNA

Para se obter uma melhor separação cromatográfica foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas duas colunas analíticas, uma com fase C_8 (mais polar), e com uma coluna C_{18} (menos polar). Com ambas as colunas obteve-se uma boa resolução e boa separação dos compostos de interesse. A Figura 17 mostra uma sobreposição dos cromatogramas resultantes da injeção da mistura dos padrões em concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Selecionou-se a coluna C_{18} em função dos maiores valores de áreas dos picos das sulfonamidas, confirmando-se os dados encontrados na literatura que citam maior utilização da coluna C_{18} .

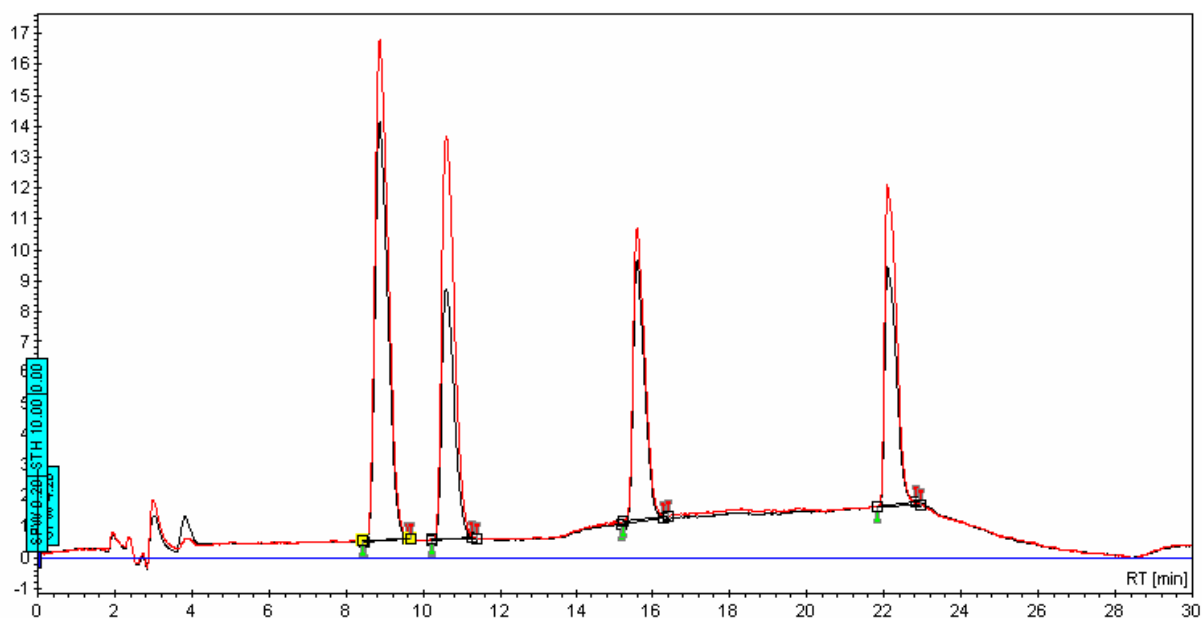


Figura 17 - Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando C_{18} (cromatograma vermelho), C_8 (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).

6.3 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é muito importante na separação dos analitos devido à interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a proporcionar uma resolução adequada dos analitos, boa separação, menores tempos de

retenção, mantendo, entretanto, a solubilidade dos analitos no decorrer da separação cromatográfica e, principalmente, sem interferir na detecção dos analitos de interesse.

6.3.1 Seleção do pH da fase móvel

As sulfonamidas estudadas apresentam caráter anfótero (solubilidade entre 1 e 192 mg/100mL de água a 27°C) e valores de pK_a entre 6,21 e 7,45. Vários trabalhos na literatura apontam o uso de solução-tampão de acetato de sódio (pH 4,5) na fase móvel, justificando que seu uso mantém as espécies iônicas estáveis no decorrer das análises. A escolha do pH da solução-tampão constitui-se, então, em um fator importante. Foram feitos testes para verificar em qual pH as sulfonamidas estudadas teriam a melhor resposta no detector DAD. Os valores de pH testados foram: 3,5; 4,5 e 5,5, como apresentado na Figura 18. Para a realização dos testes de pH utilizou-se acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Em todos os valores de pH obteve-se boa separação e resolução. Entretanto, em pH 4,5 melhores resultados foram obtidos, quando se comparando as áreas dos picos nos três valores de pH.

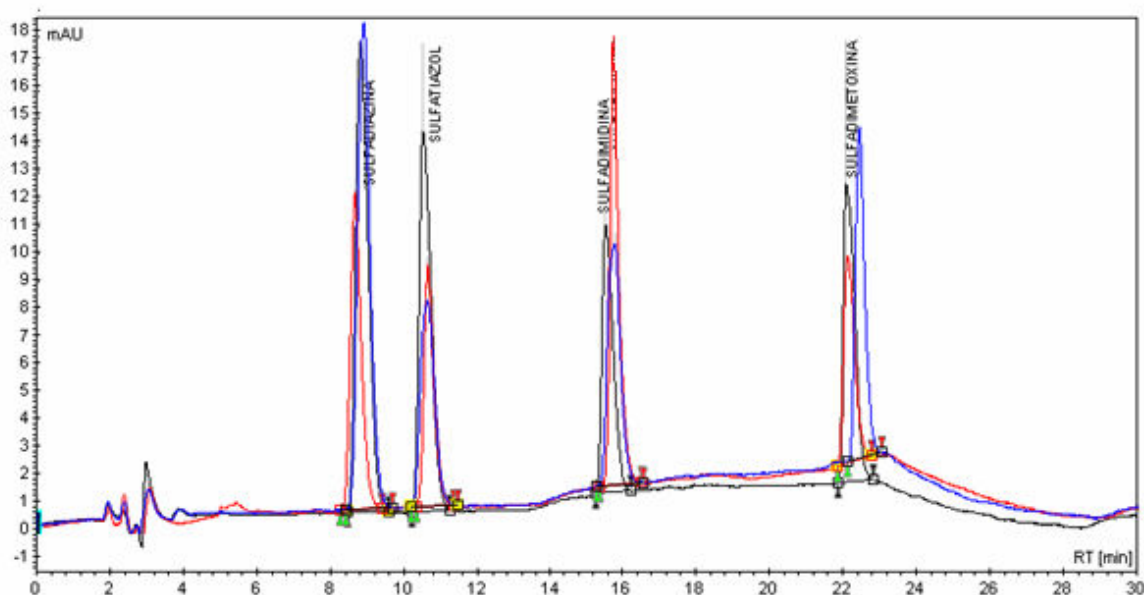


Figura 18 - Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto)

6.3.2 Composição da fase móvel

No Quadro 4 são apresentados os testes realizados no estudo da composição da fase móvel.

Teste	Gradiente			Composição da Fase móvel	
	t (min)	%	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
Teste 1	0	10:90	1,0	Metanol	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 2	0	10:90	1,0	Metanol	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 3	0	10:90	1,0	Metanol	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 4	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 5	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 6	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			

*t – tempo em minutos; % - proporção de solvente

Quadro 4 - Testes para seleção da composição da fase móvel

Quando metanol foi empregado na fase móvel, independente da composição da fase aquosa, não foi possível observar todos os picos das sulfonamidas injetadas. Em todos os

testes em que foi utilizado este solvente, observou-se somente os picos da sulfadiazina, sulfatiazol e sulfadimidina, não sendo identificando sinal para sulfadimetoxina. Este fato pode ser explicado em função do poder de arraste do metanol, que não deve ter sido suficiente para detectá-la nas condições estabelecidas. Os resultados dos testes feitos com tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e solução de ácido acético 0,1% apresentaram áreas dos picos maiores que as obtidas quando utilizando água na fase móvel. Na Tabela 7 são apresentados a quantidade e os respectivos compostos separados no estudo da composição da fase móvel. Os cromatogramas típicos obtidos com os melhores resultados para cada teste de composição da fase móvel são apresentados nas Figuras 19, a e b.

Para os testes empregando-se acetonitrila, melhores resultados foram encontrados para todas as composições da fase móvel. Utilizando-se ACN: solução de ácido acético 0,1% e ACN: tampão acetato de sódio pH 4,5, resolução e separação adequadas foram observadas para as quatro sulfonamidas. Acetonitrila e água apresentaram melhores resultados sendo, assim, selecionados como os solventes adequados para a fase móvel (Figura 19 - b).

No ANEXO 03, são apresentados todos os cromatogramas dos testes realizados nos estudos da composição da fase móvel.

Tabela 7 – Estudo da composição da fase móvel.

Teste	Quantidade de compostos separados	Compostos separados
01 (MeOH:H ₂ O)	03	SDZ, STZ, SDD
02 (MeOH:TAMPÃO)	03	SDZ, STZ, SDD
03 (MeOH:ÁGUA ÁC 0,1%)	03	SDZ, STZ, SDD
04 (ACN:H ₂ O)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
05 (ACN:TAMPÃO)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
06 (ACN: ÁGUA ÁC 0,1%)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM

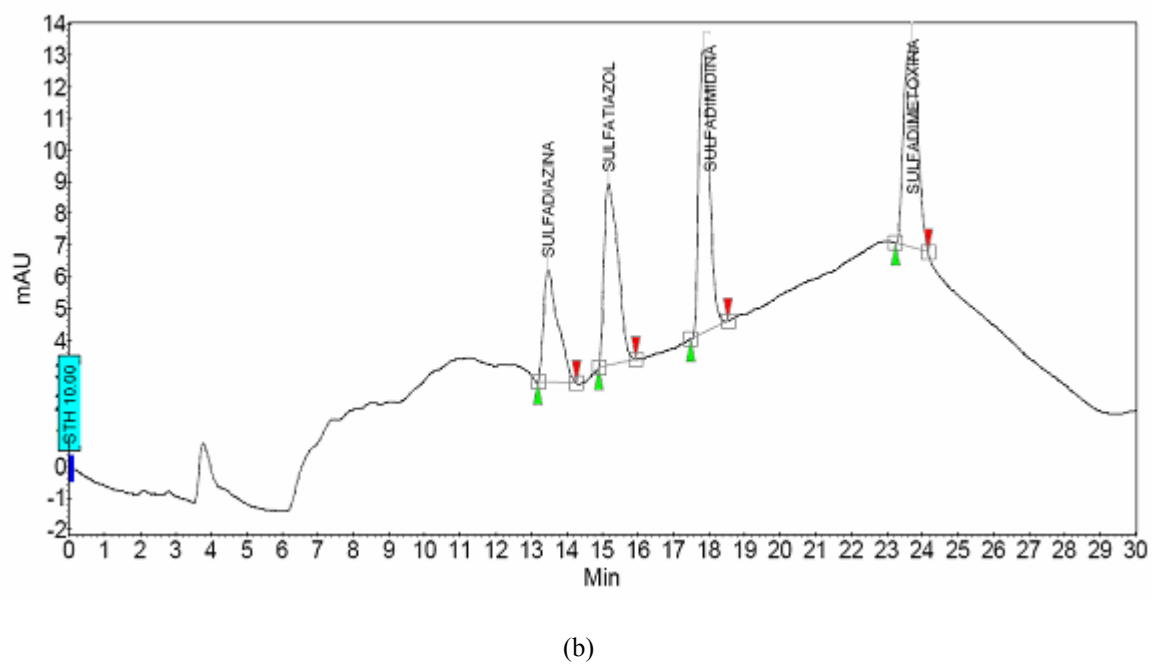
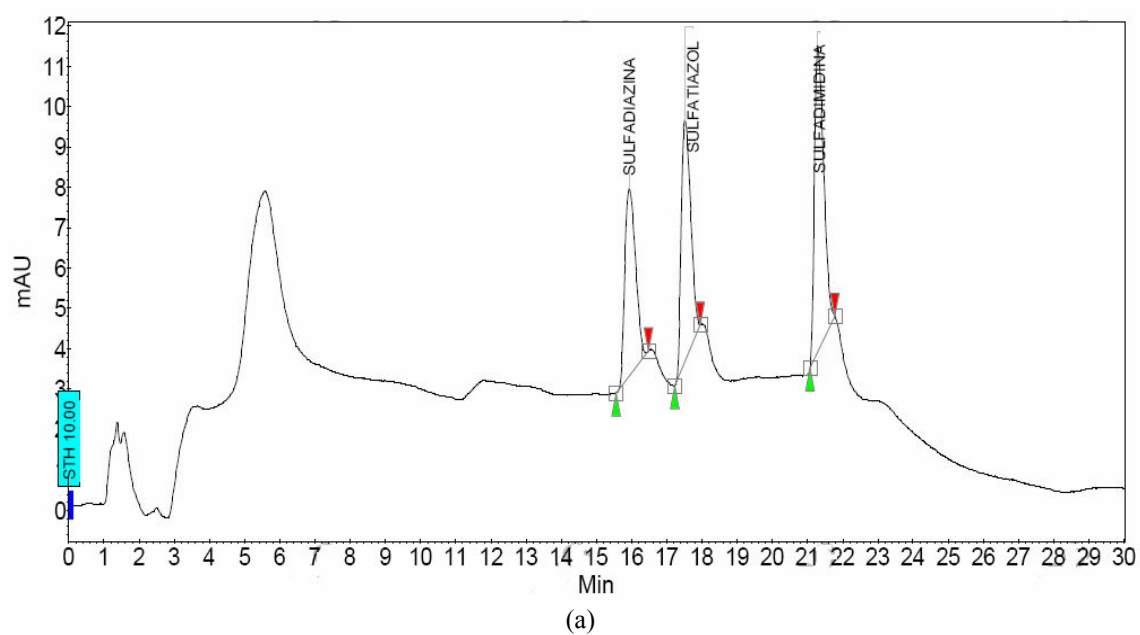


Figura 19 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água

6.3.3 Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho

As sulfonamidas são compostos ligeiramente solúveis em água, e apresentam maior solubilidade em soluções ácidas ou básicas e em solventes orgânicos [9]. Segundo Sun *et al.* [9], a solução de ácido acético 0,1% quando utilizada como solvente para as soluções de trabalho, proporciona picos cromatográficos mais definidos. Para Pecorelli *et al* [18], as soluções de trabalho devem ser preparadas usando-se solução tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, uma vez que favorecem a estabilidade das sulfonamidas.

Para se obter resolução e separação cromatográfica adequadas foram testados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho. Dois testes foram realizados, utilizando-se solução-tampão de acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e utilizando-se solução de ácido acético 0,1%. Para ambos os solventes foram obtidos resultados satisfatórios, entretanto, a solução tampão (Figura 20) forneceu maiores áreas dos picos cromatográficos, tendo-se optado por este solvente para a realização das demais análises.

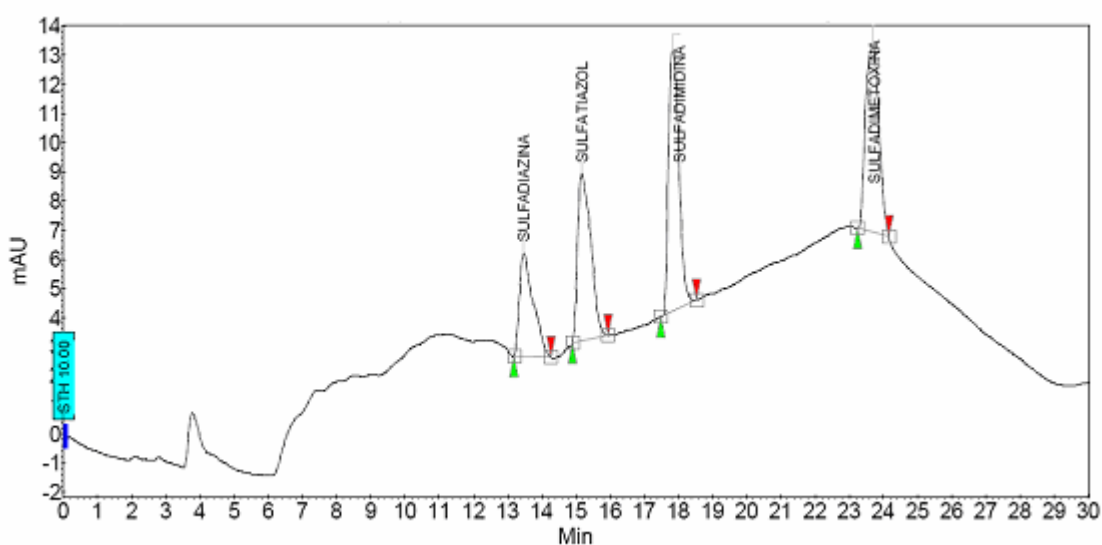


Figura 20 - Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5.

Outro teste realizado foi a otimização do tempo de análise. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação e a resolução dos picos, o fluxo da fase móvel foi variado de $0,4$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados demonstraram que quanto menor o fluxo da fase móvel sulfadiazina e sulfathiazol apresentam tempos de retenção bem próximos dificultando a

separação dos picos. Em fluxos maiores ocorre uma melhor separação. O fluxo de 1 mL min⁻¹, apresentou os melhores resultados podendo-se observar separação dos picos satisfatória.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Depois de selecionadas as condições cromatográficas foram realizados cinco repetições em concentração 1,0 mg L⁻¹ para cada sulfonamida, com os melhores resultados dos testes anteriores. Na Tabela 8 são listadas as condições cromatográficas selecionadas. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 8 - Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.

Item	Condições
Equipamento	CLAE-DAD
Coluna	CL-18, 150mm x 4,6mm, 4µm - Phenomenex
Coluna de Guarda	KJO-4282 – Phenomenex
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Água
Proporção dos solventes	10:90
(A:B)	15:85
	30:70
	40:60
	15:85
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	278 nm

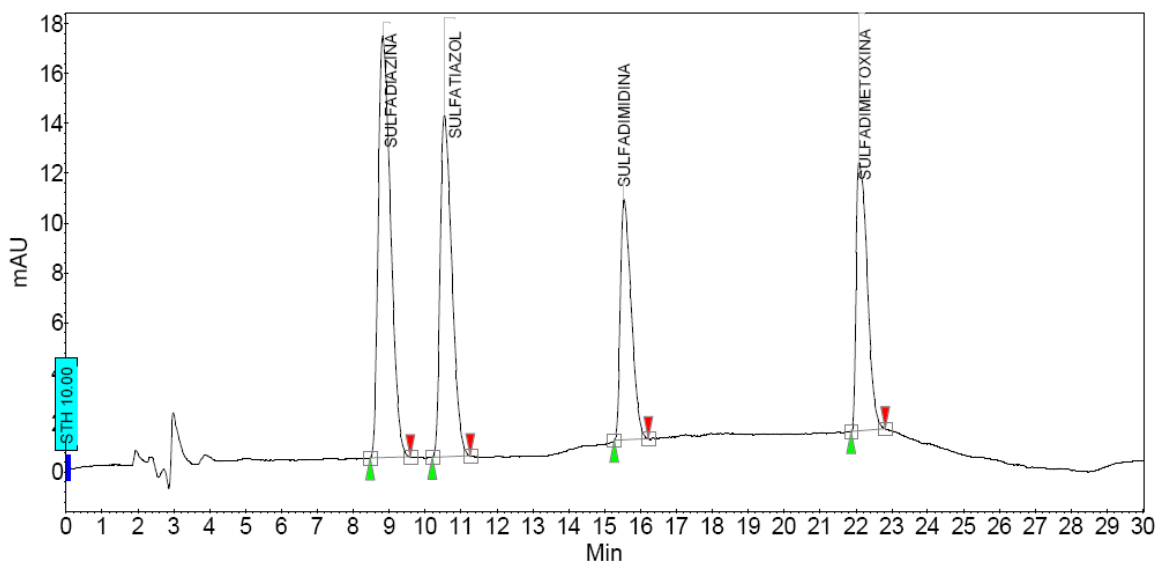


Figura 21 - Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L⁻¹.

A estabilidade dos padrões também foi avaliada nesta etapa. A avaliação da estabilidade das soluções intermediárias utilizadas na metodologia analítica foi realizada com o objetivo de verificar a ocorrência de degradação do analito. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos padrões durante a estocagem a -10°C em um período de 3 meses. As amostras foram analisadas após 1 semana, 1, 2 e 3 meses. Definiu-se como critério de aceitação variações menores que 20% em relação à concentração inicial, levando-se em consideração possíveis alterações ocasionadas pelo próprio armazenamento.

Verificou-se que a estabilidade dos padrões é mantida por até 3 meses e 7 dias, após esse período a concentração dos padrões sofre uma perda média do analito de aproximadamente 40 %. A Figura 22 apresenta um gráfico com a percentagem de degradação das soluções-padrão.

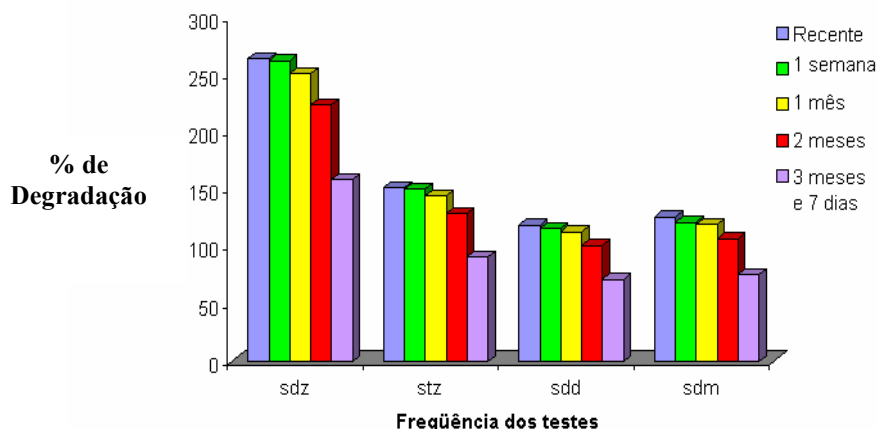


Figura 22- Estudo da degradação das soluções-padrão

6.5 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS

A metodologia de extração utilizada neste trabalho baseou-se em estudos de; SUN *et al.* [9]; BISWAS *et al.* [71]; WANG *et al.* [67]; ZOTOU e VASILADOU [11]; MAUDENS, ZHANG E LAMBERT [63]; PECORELLI *et al.* [18]; MARTEL e ZEGANNE [64]; PANG *et al.* [65]; CANCHO-GRANDE *et al.* [116]; FURUSAWA [14]; STOEV & MICHAILOVA [80]; VIÑAZ *et al.* [86]; HORIE *et al.* [66].

Os testes foram realizados utilizando-se extrato de mel, preparado pela diluição de 1,0 g de mel em água + solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (amostra sem hidrólise ácida) e extrato hidrolisado de mel (1,0 g de mel + solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}). Foram utilizados volumes de 100,0 mL de amostras fortificadas com as sulfonamidas de interesse. Para os testes preliminares utilizou-se nível de fortificação de 50 ng g^{-1} de cada sulfonamida. A extração foi realizada em triplicata e as injeções cromatográficas também foram feitas em triplicata. Avaliou-se a recuperação de cada composto após os procedimentos de extração, comparando-se com a injeção, direta dos padrões das sulfonamidas. Uma vez estabelecidas as condições, novos testes foram realizados, utilizando-se três níveis de fortificação (25 , 50 e 100 ng g^{-1}).

6.5.1 Pré-tratamento da amostra

Em síntese, podemos definir o mel como um produto açucarado, constituído em sua maioria por açúcares. As sulfonamidas têm como característica formarem ligações com açúcares, principalmente ligações com açúcares redutores, podendo formar uma variedade de diferentes compostos açúcar-sulfonamida [114] o que poderia modificar o comportamento dos picos cromatográficos pelo efeito de matriz. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre açúcar e sulfonamida, estudada por Sheth *et al.* [114]. No citado estudo, realizou-se uma reação de uma molécula de sulfatiazol com uma molécula de açúcar redutor, ocorrendo a formação de uma base de Schiff (n-glucosilamina) e liberação de uma molécula de água, formando-se em seguida um composto de Amadori e, após um longo período de armazenamento, o autor comenta a possibilidade de formação de outros produtos da reação de Maillard. O referido autor cita também que sobre condições ácidas a tendência é a formação de sulfonamidas livres devido a ionização do grupo amina. O autor ainda afirma que a ligação de açúcares-sulfatiazol poderá ocorrer com outras sulfonamidas também.

Schwaiger e Schuch [115] estudaram e provaram que para a determinação de sulfonamidas em mel é necessário uma etapa de hidrólise ácida antes da análise cromatográfica para quebrar as ligações açúcar-sulfonamida. Observaram também que após a hidrólise ácida é necessário realizar um ajuste no pH do meio para 4,5 para que as sulfonamidas permaneçam estáveis no meio.

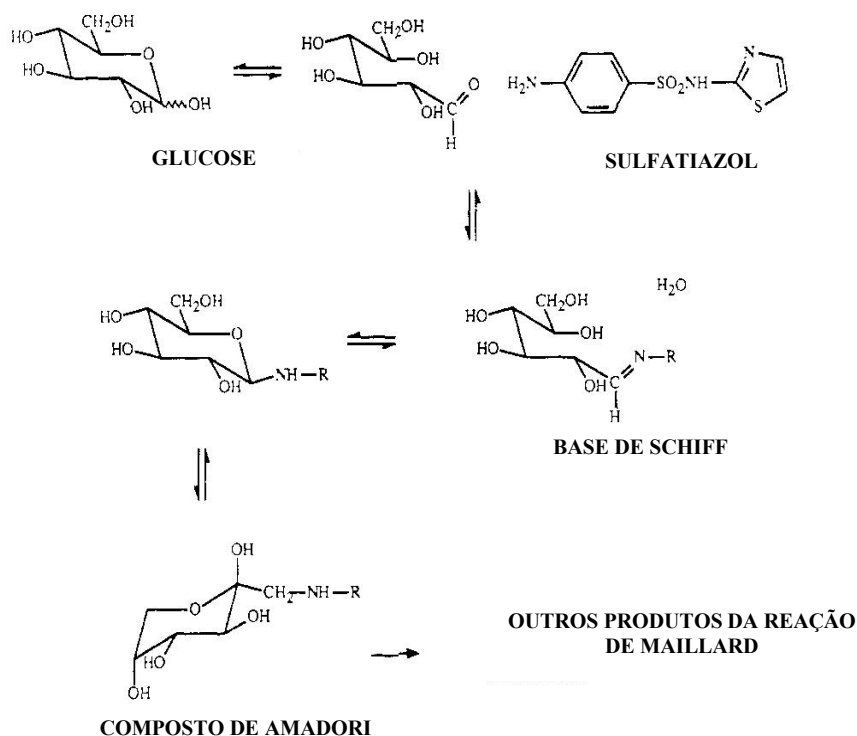


Figura 23 – Esquema da reação açúcar-sulfonamida.
 Fonte: adaptado de [114].

Inicialmente foram realizados testes para selecionar as melhores condições para o pré-tratamento da amostra. Na Tabela 9 são apresentados os testes realizados.

Tabela 9 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

Após definidas as condições para a hidrólise foram realizados dois testes com a matriz. O primeiro consistiu somente na diluição de 1,0 g de mel em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5, neste caso não utilizou-se hidrólise ácida. O segundo teste consistiu na realização de uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico, como descrito na seção 5.3.2.1. Os resultados dos testes de hidrólise mostraram que as variáveis que mais influenciam na eficiência da hidrólise ácida são concentração e volume de ácido adicionado e tempo de agitação. A forma de agitação influencia, mas não como as outras variáveis. A concentração do ácido mostrou ser uma variável muito importante, sendo a concentração de 2M a mais eficiente. O volume de ácido adicionado influencia tanto na dissolução quanto na eficiência da hidrólise. O tempo de agitação também está diretamente ligado à eficiência da hidrólise. O conjunto de condições: concentração de 2M e tempo de 30 minutos, apresentou bons resultados, mas não melhores dos que os apresentados na mesma concentração e tempo de 45 minutos.

Das condições estudadas, os melhores resultados foram os obtidos pelo seguinte conjunto: concentração de 2M, 2 mL de ácido e 45 min. O volume de 2 mL propiciou melhores resultados, no entanto, dificulta a dissolução do mel, tendo-se optado pela adição de volume de 5 mL. A agitação em banho ultra-som foi escolhida por apresentar resultados um pouco melhores do que os encontrados com o uso da mesa agitadora. Nas Figuras 24 - a e b, são apresentados os cromatogramas correspondentes a este teste. Pode-se observar através das Figuras que sem hidrólise do mel ocorreram muitos ruídos, porém a evidência mais importante é que não foram observados os picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas de interesse. Na amostra testemunha fortificada foram observados vários picos interferentes em tempos de retenção próximos aos dos picos das sulfonamidas de interesse. A

ocorrência destes picos cromatográficos pode ocasionar diminuição nas áreas dos picos cromatográficos das sulfonamidas de interesse o que pode levar a resultados errados. Na Figura 24 b é apresentado um cromatograma típico de uma amostra de testemunha fortificada sem passar por uma etapa de hidrólise ácida.

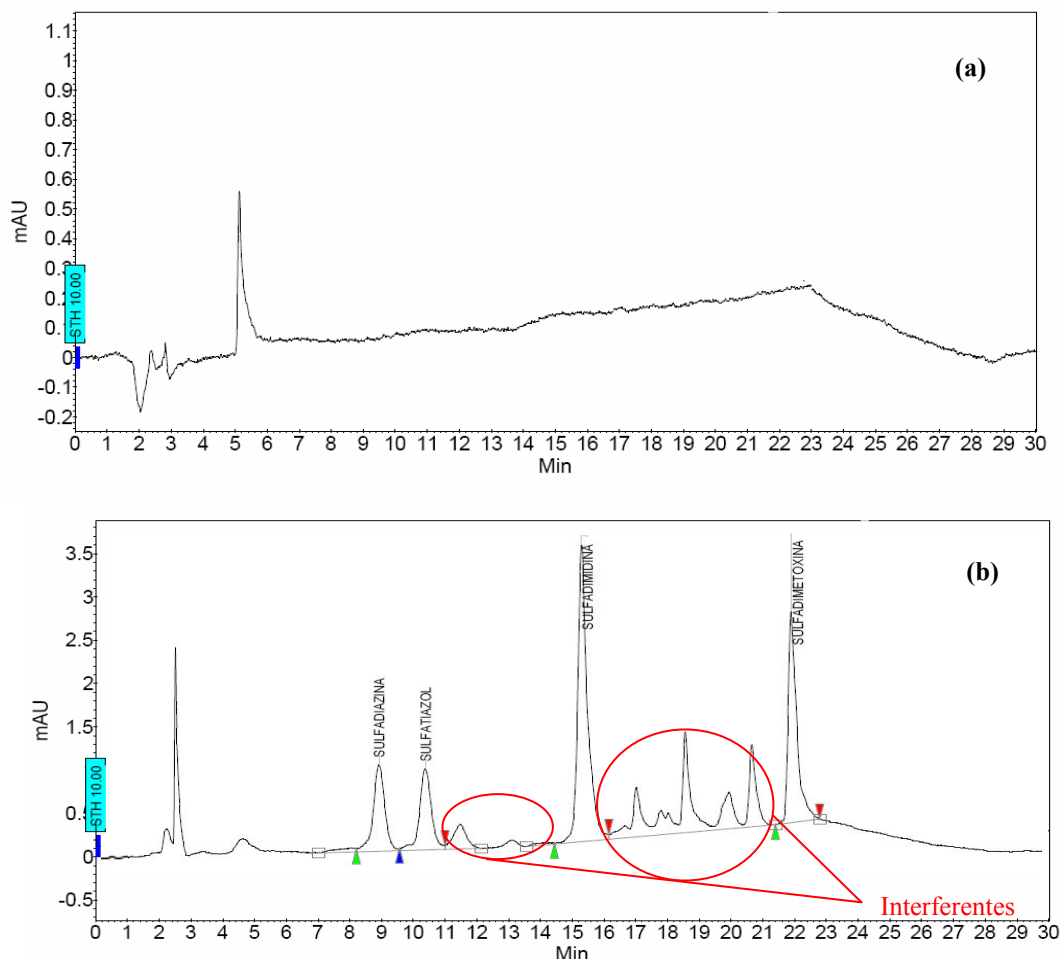


Figura 24 - Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹, sem hidrólise ácida.

De um modo geral, todos os testes de hidrólise mostraram-se etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. Para o mel submetido à etapa de hidrólise ácida, foi possível perceber melhora do ruído no cromatograma, não sendo também observados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Os melhores resultados são mostrados nas Figuras 25 - a e b.

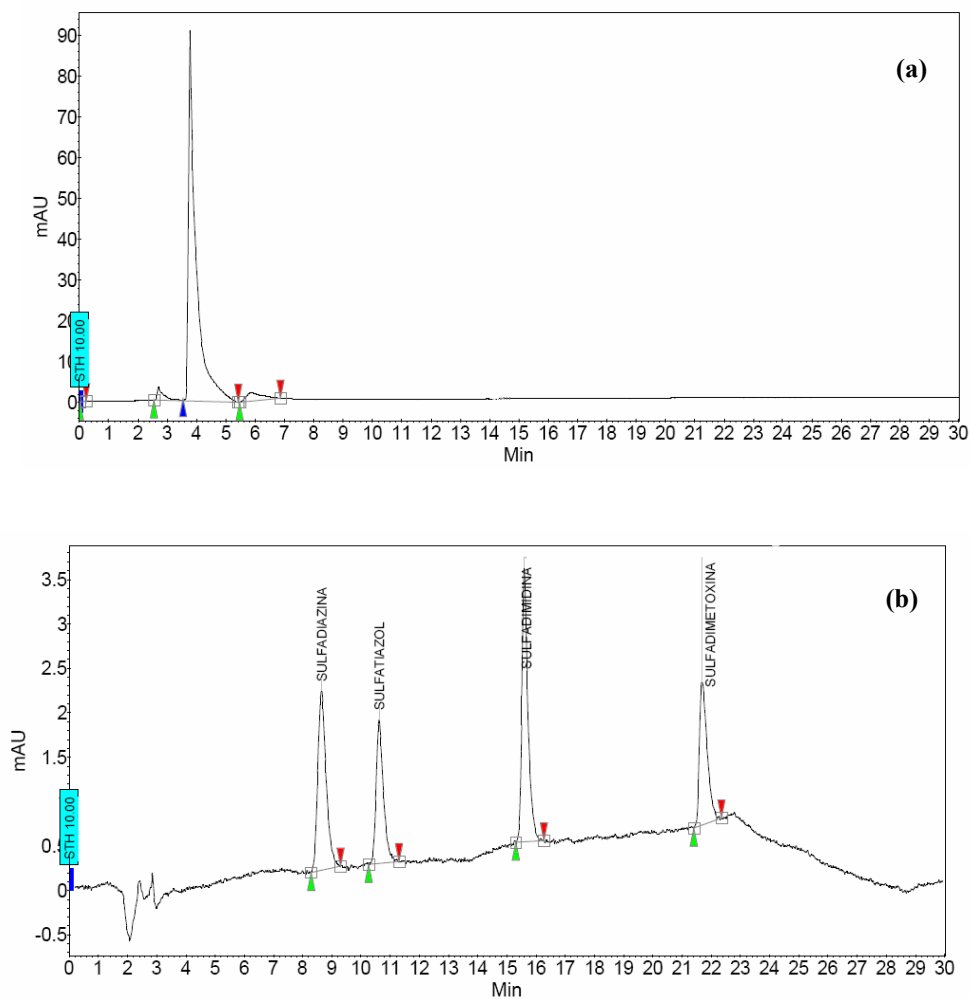


Figura 25 - Cromatogramas obtidos nos testes de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , com hidrólise ácida.

Pode-se evidenciar por este estudo a importância da etapa de hidrólise ácida, observando-se no cromatograma sem hidrólise a presença de vários picos interferentes próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, o que levou a uma redução das áreas dos picos dos compostos. Com a amostra de mel submetida à hidrólise ácida o cromatograma quase não evidenciou interferentes, tendo apresentado separação adequada dos picos das sulfonamidas.

6.5.2 Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração por fase sólida

Os testes realizados para escolha do adsorvente, solvente para condicionamento do cartucho e solvente para eluição tiveram por objetivo escolher o conjunto de condições que oferecessem a melhor eficiência na extração, ou seja, os melhores resultados de recuperação. As recuperações obtidas na extração de compostos nos níveis de concentração estudados deve ser entre 70-120%. As fases e condições utilizadas nas extrações são citadas na Tabela 10.

Cabe mencionar, que a eficiência da extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na amostra de mel fortificada em relação ao analito em solução padrão.

Tabela 10 - Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)

Teste	Cartucho	Condicionamento
Teste 1	C-8	MA/MAT/AA/AAT*
Teste 2	C-18	MA/MAT/AA/AAT
Teste 3	Nexus	MA/MAT/AA/AAT

***MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.**

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos testes de eficiência de extração. Quando metanol foi utilizado como solvente de eluição recuperações inferiores a 70% foram obtidas.

Tabela 11 - Resultados dos testes de eficiência de extração

Analito	Eluente	Eficiência da extração (% de recuperação)											
		C8 (teste 1)				C18 (teste 2)				Nexus (teste 3)			
		MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT
SDZ	MeOH	42	41	49	48	53	64	56	60	57	60	62	65
	ACN	61	67	65	70	66	70	68	73	73	79	80	84
	Tampão	58	62	61	62	67	73	70	76	73	77	79	83
STZ	MeOH	39	45	40	48	55	51	51	56	51	58	56	59
	ACN	56	60	55	65	62	64	63	71	60	67	75	84
	Tampão	51	60	55	60	55	63	66	70	62	66	68	76
SDD	MeOH	42	45	44	47	55	61	64	63	53	60	53	63
	ACN	60	65	62	66	63	68	67	66	72	76	74	79
	Tampão	62	64	63	57	66	72	74	68	64	69	70	78
SDM	MeOH	43	47	42	45	51	59	54	61	55	58	52	61
	ACN	60	63	62	67	70	64	67	63	73	76	66	79
	Tampão	55	58	56	58	72	75	74	78	71	74	78	82

Analisando-se os resultados da Tabela 11, observa-se que os cartuchos Nexus proporcionaram recuperações, de 51 a 65%, em todos os tipos de condicionamento realizados. Para os cartuchos C18, as recuperações variaram entre 51-64%. Com cartucho C8 menores recuperações foram obtidas de 41-49%, supondo-se problemas com a polaridade da fase.

Dos condicionamentos testados, os solventes acetonitrila/água/tampão foram os que apresentaram melhores resultados para todos os cartuchos. A utilização de tampão no condicionamento proporcionou melhores resultados. Os solventes metanol/água foram a sequência que apresentaram menores valores de recuperação.

Para a eluição, verificou-se que, com acetonitrila, as recuperações foram melhores dos que as obtidas quando metanol foi utilizado como solvente de eluição dos analitos. As recuperações encontradas foram de 51-84%. Analisando-se os resultados dos testes utilizando-se acetonitrila como eluente, observou-se que com cartuchos Nexus, melhores recuperações foram também obtidas (60-84%). O cartucho C18 também apresentou resultados satisfatórios (62 a 73%). Para o cartucho C8, menores recuperações (55-70%) foram obtidas.

As extrações utilizando tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹), pH 4,5 e adição de 1% de metanol como eluente para os analitos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com acetonitrila. As recuperações para os cartuchos Nexus foram de 62-83%. Já

para o cartucho C18 foram de 55-79% e para o cartucho C8 as recuperações foram de 51-62%.

Com base nos resultados encontrados, quanto ao material que constitui a fase sólida do cartucho, pode-se observar que o cartucho Nexus apresentou uma maior interação com as moléculas dos analitos dos que as fases sólidas C8 e C18 obtendo-se melhores resultados em todos os testes. Os resultados dos testes realizados com os cartuchos C8 não foram satisfatórios para nenhuma das condições testadas. Pressupõe-se que a polaridade da fase possa ter interferido na extração. E como eluente a acetonitrila apresentou os melhores resultados, incluindo secagem mais rápida sob fluxo suave de nitrogênio.

Objetivando-se promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes também foram realizados dois testes de *clean-up*, ambos utilizando-se cartuchos de *Florisil*, 500 mg/6mL. O primeiro teste (*clean-up* 1) foi realizado com 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila e o segundo teste (*clean-up* 2) foi realizado com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após a passagem das amostras pelos cartuchos de *Florisil*, submeteu-se a fluxo suave de nitrogênio até a secura. As amostras foram retomadas com 1 mL de acetonitrila e injetadas. A Figura 26 apresenta os resultados dos testes de % de recuperação das quatro sulfonamidas estudadas com as duas condições de *clean-up* testadas.

Dentre os procedimentos empregados, o que demonstrou maior recuperação do analito foi o que empregou 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila. No entanto, estes resultados não foram melhores do que os obtidos quando não realizado procedimento de *clean up* com cartuchos de *Florisil*, optando-se, portanto pela não utilização deste passo nas demais análises para a determinação de sulfonamidas em mel.

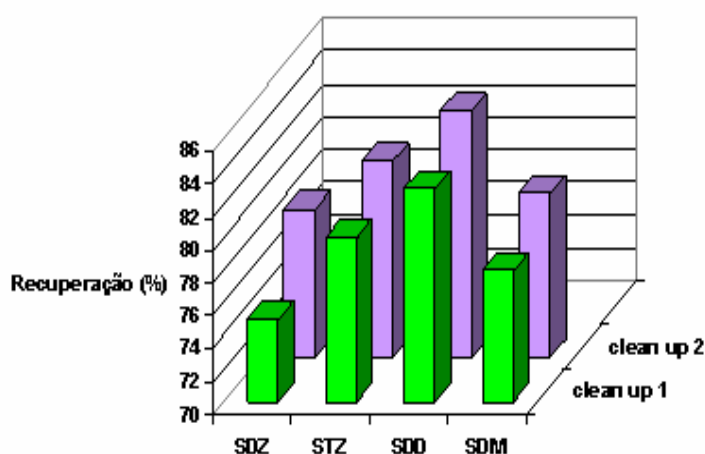


Figura 26 - Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de *clean-up*.

Depois de selecionadas todas as condições de extração, foram realizados novos experimentos de extração, em triplicata, em três níveis de concentração: 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para otimizar as condições de extração do método desenvolvido. Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração selecionadas.

Tabela 12 – Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.

Composto	Concentração		
	25 ng/g	50 ng/g	100 ng/g
SDZ			
Rec±RSD, (%)	80 ± 12,50	83 ± 8,43	85 ± 5,88
STZ			
Rec±RSD, (%)	71 ± 15,49	76 ± 11,84	80 ± 7,50
SDD			
Rec±RSD, (%)	77 ± 12,99	81 ± 9,88	83 ± 6,02
SDM			
Rec±RSD, (%)	75 ± 13,33	79 ± 10,13	81 ± 6,17

*n=3

Na Figura 27 é apresentado o cromatograma no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹ obtido após estabelecimento das condições de extração.

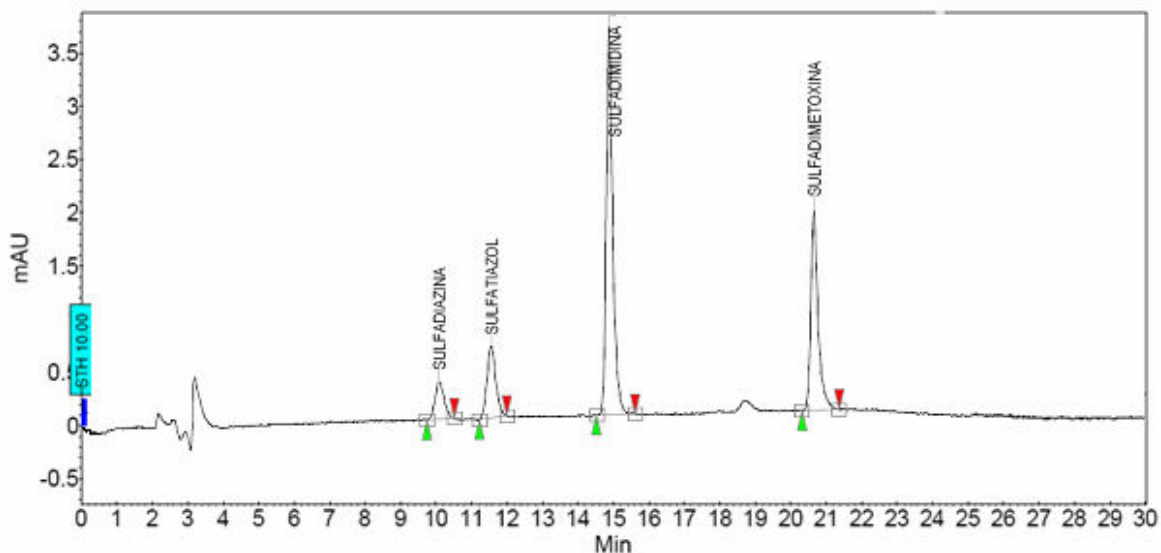


Figura 27 - Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas e otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica, como no preparo da amostra para a determinação das sulfonamidas por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de sulfonamidas no mel. Antes da validação, verificou-se a conformidade do sistema seguindo as recomendações da *Food and Drug Administration* – FDA, 2004.

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

6.6.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros da conformidade do sistema avaliados: número de pratos (N), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As), estão de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas vigentes e foram obtidos satisfatoriamente. Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos dos parâmetros para verificação da conformidade do sistema cromatográfico.

Tabela 13 - Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico

Sulfonamidas	t _R	N	k	Rs ^(*)	As
SDZ	8,45	8002,23	1,6	3,0	1,04
STZ	10,33	8710,16	2,8	6,74	1,25
SMZ	15,24	12014,63	3,4	8,44	1,20
SDM	22,09	26853,47	4,0	11,41	1,00

t_R – tempo de retenção das sulfonamidas; N – número de pratos teóricos; k – fator de retenção; Rs – resolução; As – fator de assimetria

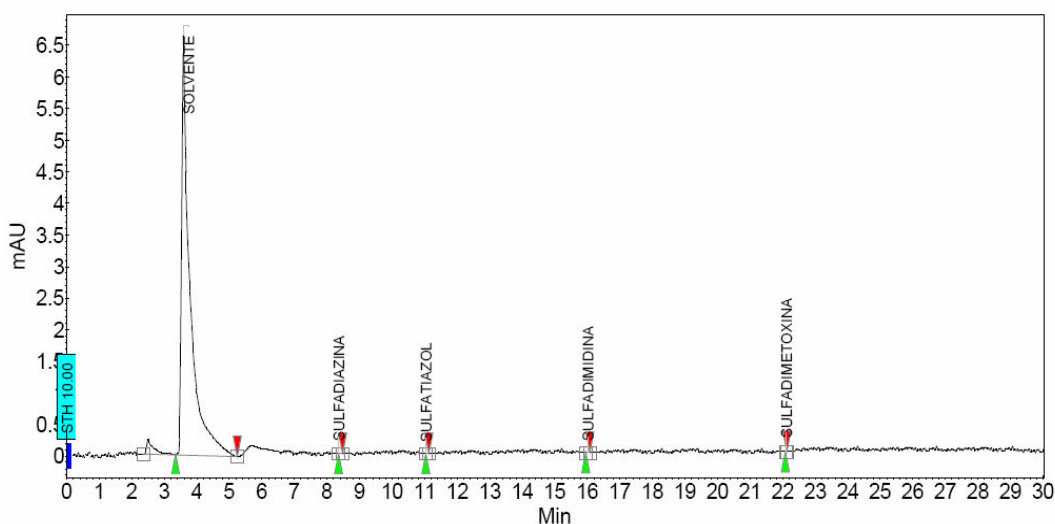
(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes.

Considerando-se as condições citadas por SHABIR [113]: $1 \leq k \leq 10$; $Rs > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

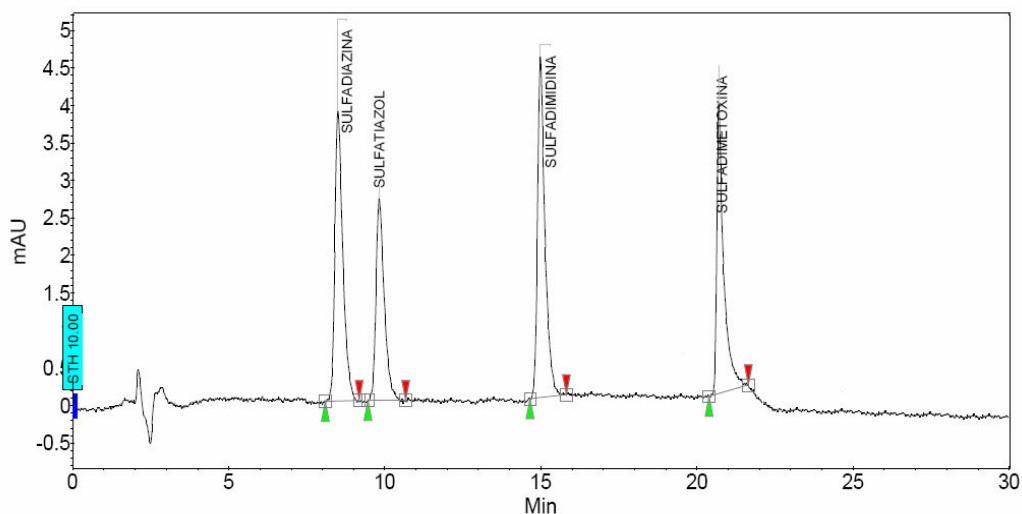
6.6.2 Seletividade

O estudo da seletividade do método teve como objetivo quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no mel. A seletividade foi testada analisando-se o extrato da amostra testemunha (extrato contendo só mel) e o extrato da amostra testemunha fortificado com as sulfonamidas (extrato contendo mel fortificado com as sulfonamidas).

No extrato da amostra testemunha não foram observados picos interferentes referentes aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, durante toda a separação cromatográfica. Foram observados apenas sinais característicos do solvente. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28 - a e b.



(a)



(b)

Figura 28 - Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.

Segundo a ANVISA não são recomendados que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito sejam superiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Como verificado na Figura 31, não existem picos interferentes, conclui-se, portanto, que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

6.6.3 Curva analítica

Foram construídas curvas analíticas, com soluções-padrão. As curvas analíticas com os padrões foram feitas com cinco injeções sucessivas (em quintuplicata), de cada ponto das curvas (25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$), sempre da menor para a maior concentração, sendo utilizada a média das leituras para a construção das curvas.

As curvas foram construídas plotando-se a área do pico *versus* a concentração do analito (Figura 29), onde y é a resposta em unidades de área e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

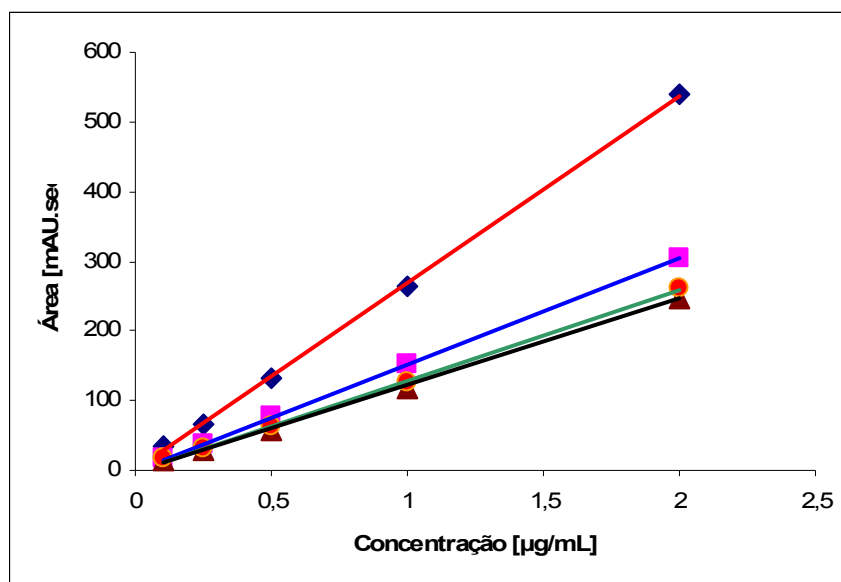


Figura 29 – Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).

Os valores das leituras foram submetidos a tratamentos estatísticos para obtenção dos coeficientes de correlação (r^2) e as equações das retas de cada sulfonamida pela extrapolação dos dados com o uso do *software Origin 6.0* e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão

Sulfa	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação de regressão	Coeficiente de correlação (r^2)
SDZ	0,025-2,0	$3,5754x - 0,021$	0.9990
STZ	0,025-2,0	$2,9936x - 0,043$	0.9996
SDD	0,025-2,0	$2,3462x - 0,019$	0.9994
SDM	0,025-2,0	$2,2321x - 0,063$	0.9983

Os coeficientes de correlação encontrados, todos superiores a 0,9900, demonstraram que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração estudado. Os resultados encontrados estão de acordo com as recomendações da ANVISA [58] para a validação de métodos analíticos.

6.6.4 Faixa linear, linearidade, sensibilidade

Para todo método existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,9900. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

A linearidade da resposta foi determinada através da habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear.

A sensibilidade foi estudada como a resposta do detector em função da concentração do analito, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

6.6.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das soluções-padrão das sulfonamidas em concentração decrescentes. Os limites de

detecção e quantificação foram calculados através das relações sinal/ruído. Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação.

6.6.6 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g⁻¹). O nível de fortificação utilizado nesta pesquisa baseou-se no LMR estabelecido pelo PNCR, do MAPA.

Tabela 15 - Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SDM
Faixa linear (µg mL ⁻¹)	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0
Sensibilidade (µau mL µg ⁻¹)	-0,021	- 0,043	-0,019	-0,063
Linearidade (r ²)	0.9990	0.9996	0.9994	0.9983
Precisão intra-ensaio (%RSD) n=5	2,84	5,24	4,31	3,01
Precisão inter-ensaio (%RSD) n=5				
25 ng g ⁻¹	12,99	11,11	12,65	10,81
50 ng g ⁻¹	5,81	8,64	7,14	6,02
100 ng g ⁻¹	3,41	4,88	3,49	3,57
LD (ng mL ⁻¹)	20	25	30	30
LQ (ng mL ⁻¹)	66	75	90	90

6.6.6.1 Precisão

Segundo o INMETRO [95] a precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Nesta pesquisa a precisão intra-ensaio foi avaliada mediante a análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, de duas amostras de mel fortificadas até a concentração de 100 ng g^{-1} . O RSD para todas as sulfonamidas ficou na faixa de 2,84 a 5,81% (Tabela 15). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de mel fortificadas em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}) em três dias diferentes, em quintuplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todas as sulfonamidas foi na faixa de 3,41 a 12,99% (Tabela 15).

Para a ANVISA [58] os intervalos de desvio padrão relativo (RSD) são considerados adequados se valores até 20% forem encontrados. Como todos os valores de RSD mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto pode ser considerado preciso.

6.6.6.2 Exatidão

A exatidão é medida com relação ao quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra [104], representado pelos valores das recuperações.

Foram realizados dois testes de recuperação, um utilizando apenas um nível de fortificação (100 ng g^{-1}) e um outro utilizando três níveis de fortificação (25, 50 e 100 ng g^{-1}). Para os testes de recuperação realizados em um mesmo dia, mesmo equipamento e mesmo analista, as recuperações variaram na faixa de 83 a 89,3%, estes resultados se encontram de acordo com os valores estipulados pela ANVISA [58], confirmando a exatidão do método.

As recuperações médias das sulfonamidas nos três níveis de fortificação avaliados de 74 a 88 %. Os menores valores de recuperação foram obtidos para o menor nível de fortificação, 25 ng g^{-1} , sendo de 72% e, proporcionalmente, a melhor recuperação foi encontrada para o maior nível de fortificação, 100 ng g^{-1} (88%). Dentre as quatro sulfonamidas estudadas, a sulfadiazina foi a que apresentou os melhores resultados em todos os níveis de fortificação (77, 86 e 88%, respectivamente).

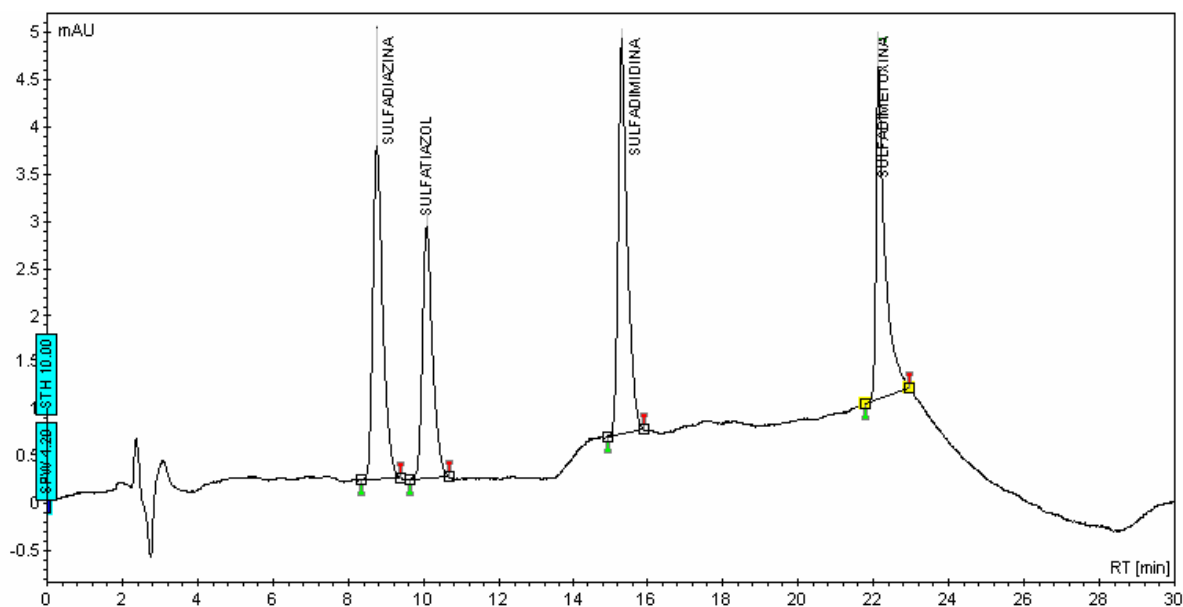


Figura 30 - Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹.

Os valores das recuperações das sulfonamidas obtidos nos três níveis ensaiados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.

Sulfa	Nível (ng g ⁻¹)	RM (%)	t _{calc}
SDZ	25	77	-1,05
	50	86	-1,40
	100	88	-2,00
STZ	25	72	-1,64
	50	81	-1,05
	100	82	-2,25
SDD	25	79	-1,05
	50	84	-1,14
	100	86	-2,33
SDM	25	74	-1,62
	50	82	-1,80
	100	84	-2,67

RM (%)= média das recuperações; t_{calc}= teste “t” de *Student* calculado

6.6.6.3 Avaliação estatística do método

Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student de significância. Na Tabela 16 são apresentados os resultados com as médias das recuperações percentuais relativas (RM%) obtidas para 5 (n-1) repetições e o t calculado para 95% do intervalo de confiança ($t_{95\%}$) do método aplicado.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados menores que o valor tabelado, $t_{tab}=2,78$, (Quadro 02 – ANEXO 2). Deste modo, aparentemente não existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), podendo-se considerar o método exato.

6.7 ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

O método proposto após ser desenvolvido e validado, foi utilizado para estimar a concentração das quatro sulfonamidas de interesse nesta pesquisa em amostras comerciais de mel provenientes do Estado do Maranhão e de estados vizinhos como o Piauí e Tocantins. Todas as amostras foram coletas no período de setembro de 2007 a março de 2008. Na Tabela 17 são apresentados o número de amostras, as cidades de coleta e suas respectivas codificações.

O objetivo destas análises foi aplicar o método desenvolvido, não realizando, portanto, um controle de qualidade mais completo nas amostras utilizadas, para o qual seriam necessárias mais amostras e aplicação de procedimentos de amostragem e coleta específicos para tal fim.

Tabela 17 – Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.

Estado	Cidade	Nº de amostras	Código
Maranhão	São Luís	01	MA1
	Santa Luzia do Paruá	01	MA2
Piauí	Teresina	01	PI
Tocantins	Paraíso	01	TO1
	Barrolândia	01	TO2

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da aplicação do método nas amostras de comerciais de mel.

Tabela 18 – Análise das amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.

Composto	Quantidade média (ng g ⁻¹) em amostras de mel, n=3				
	MA1	MA2	PI	TO1	TO2
SDZ	nd*	nd	nd	nd	nd
STZ	nd	nd	nd	nd	nd
SDD	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado, aplicando o LD de 20 ng g⁻¹ e LMR de 100 ng g⁻¹.

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os cromatogramas das amostras de méis de Santa Luzia do Paruá, São Luís, Tocantins e Piauí analisadas utilizando-se o método proposto.

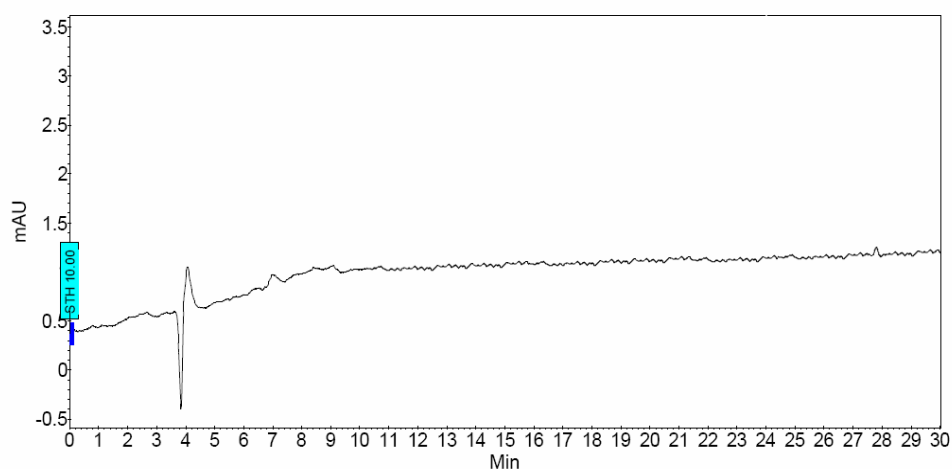


Figura 31 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá.

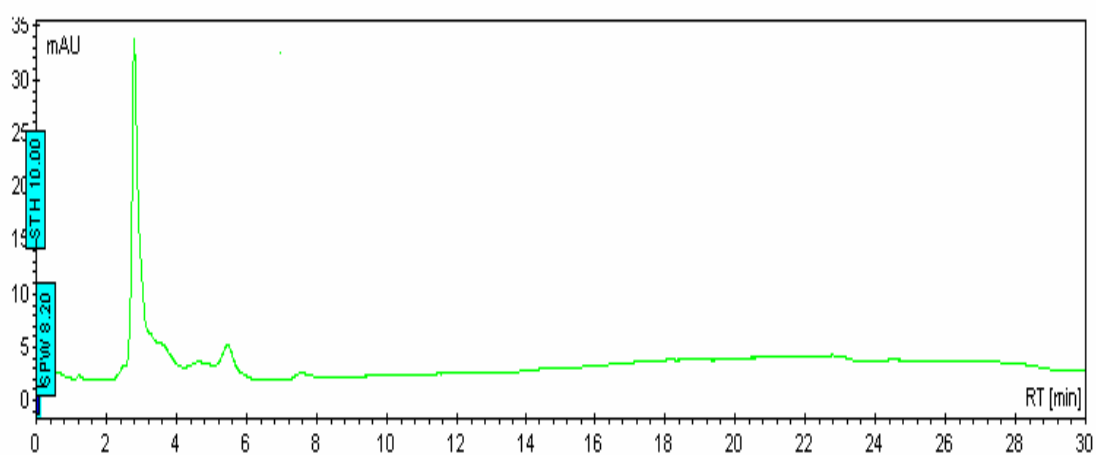


Figura 32 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.

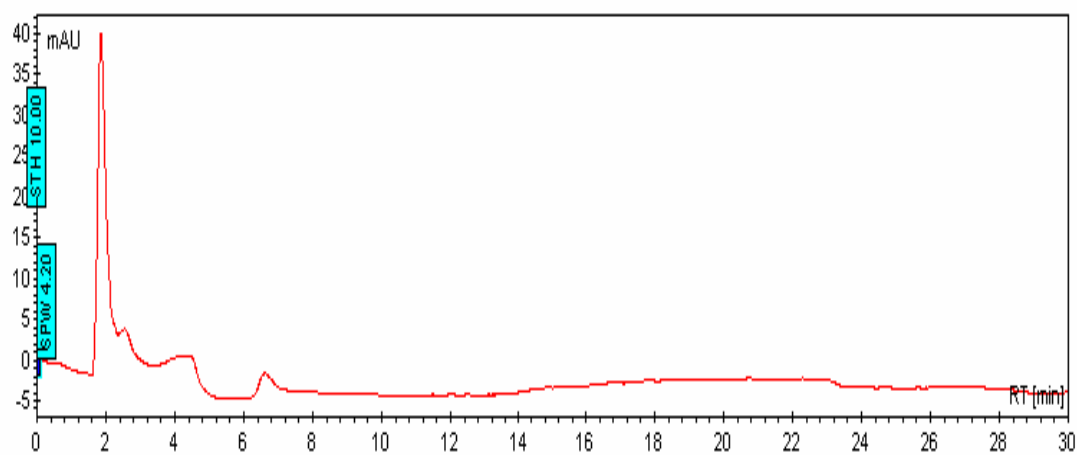


Figura 33 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins

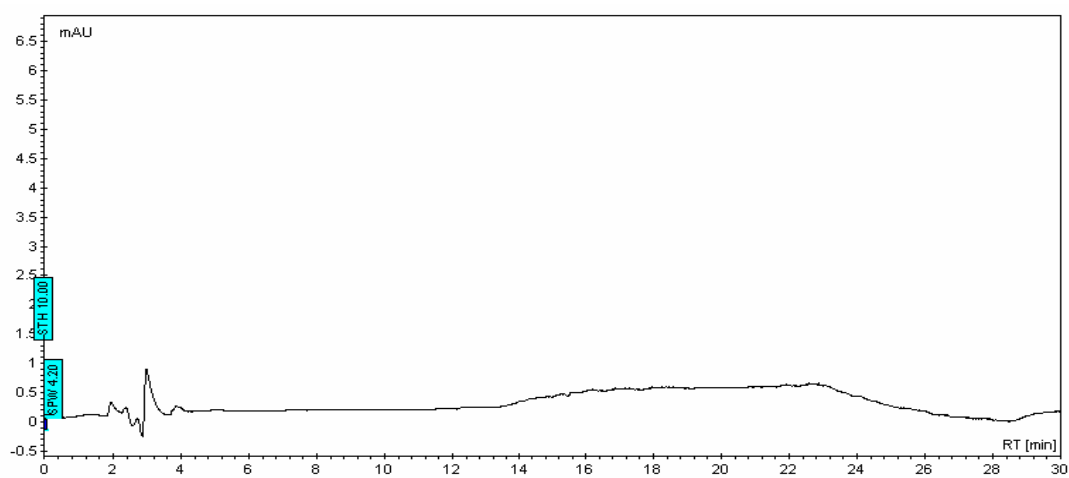


Figura 34 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí

Verifica-se pelas Figuras 31, 32, 33 e 34 que não há presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, indicando que as amostras estão livres de contaminação por resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina. Também não foram verificados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas nas outras amostras comerciais de mel estudadas.

7. CONCLUSÕES



7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel. O procedimento proposto foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato nas condições estabelecidas. Considerando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sulfonamidas ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), os limites de detecção e quantificação do CLAE-DAD apresentaram-se adequados para a análise de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel foi o preparo da amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realizou a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes.

A parte do trabalho relacionada aos estudos de pré-tratamento da amostra, ou seja, a etapa de hidrólise ácida mostrou-se eficiente para a redução do número de interferentes.

Os estudos de recuperação mostraram que para a extração de sulfonamidas em mel os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos Nexus. Foram realizados testes de recuperações em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}). As recuperações médias obtidas após otimização do método variaram de 72 a 88%, e os coeficientes de variação variaram de 2,84 a 12,99%.

Foi verificado que as amostras de mel coletadas e analisadas não apresentaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina, fato este que serve como indício da qualidade do mel produzido na Região Norte e Nordeste.

8. REFERÊNCIAS



8. REFERÊNCIAS

- [1] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000.
- [3] SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia – Relatório Completo**. Série Mercado. 2006.
- [4] PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. **Mel: Câmbio e Embargo Europeu podem prejudicar exportações em 2006**. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.4. abril/2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>> Acesso em: 19 de março de 2007.
- [5] SHIMANUKI, H. Bacteria. In: Flottum, K. (Ed.), **Honey Bee Pests, Predators, and Disease**, third ed. pp. 33–54, Medina, Ohio. 1997.
- [6] SCHWARTZ, D.P.; SHERMA, J.. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.72, 1986.
- [7] SHERMA, J.; BRETSCHNEIDER, W.; DITTAMO, M.; DIBIASE, N.; HUH, D.; SCWARTZ, J.P. **Journal of Chromatography**. v.463, p.229, 1989.
- [8] NEIDERT, E; BARANIAK, Z.; SAUVE, A. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.641, 1986.
- [9] SUN, H.; AI, L.; WANG, F. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. **Chromatographia**, v.66, N. 5/6, p.333-337, setembro, 2007.
- [10] FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M. de S.; SANTOS, J.G.R. dos; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTANA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.80-82, 2007.

- [11] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p.307-311, 2006.
- [12] GALLINA, A.; BENETTI, C.; BIANCOTTO, G.; BAGGIO, A.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; MUTINELLI, F. Antibiotics residues in honey: validation procedure. **APIACTA**, V.40, P.45-49, 2005.
- [13] ZAYAS-BLANCO, F. de; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatography separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, p.375-378, 2004.
- [14] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.
- [15] AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 3531-3539, 1990.
- [16] SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 875-879, 1990.
- [17] GARCÍA, J.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; ALDAMA, J.M. Validation of an analytical method to determine sulfamides in kidney by HPLC-DAD and PARAFAC 2 with first-order derivate chromatograms. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p. 222-234, 2007.
- [18] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European UNION REGULATION 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.23-29, 2004.
- [19] KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxyl/ N^4 -acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues and eggs. **Talanta**, v.67, p.54-58, 2005.

- [20] QUINTANA-RIZZO, J.; SALTER, R.S.; SAUL, S.J. Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin honey. **APIACTA**, V.40, P.55-62, 2005.
- [21] FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. **Chromatographia**, v.57, N. 5/6, p.317-320, 2003.
- [22] HAMMEL, Y.A; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.H.; GUY, P.A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p.58-76, 2008.
- [23] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.
- [24] MOHAMED, R.; HAMMEL, Y.-A.; LeBRETON, M.-H; TABET, J.-C.; JULLIEN, L.; GUY, P.A. Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1160, p.194-205, 2007.
- [25] LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.72, p.1082-1087, 2007.
- [26] KISHIDA, K. Quantitation and confirmatory of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, v.18, p.301-305, 2007.
- [27] BATT, A.L.; SNOW, D.D.; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, p.1963-1971, 2006.

- [28] PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, p.225-232, 2006.
- [29] KERR, W. E. **Papel das abelhas sociais na Amazônia**. Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente. (Florianópolis – SC - Brasil). 119-129. 1979.
- [30] SEBRAE, Apicultura brasileira – Produção Nacional. Disponível em : <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/IBGE.pdf> Acesso: 07 fev. 2008.
- [31] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2003 – 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1 Acesso em 23 ago, 2007.
- [32] SODRÉ, G. da S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA - APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [33] CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985, 226p.
- [34] NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [35] NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/storyhoney.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [36] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.
- [37] CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura - 01).
- [38] HOOPER, T. Guia do apicultor. [S.1]: Publicações Europ-América, p. 223-266, 1976.

- [39] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [40] SHIMANUKI, H., KNOX, D.A. Susceptibility of *Bacillus* larvae to Terramycin. **American Bee Journal**. 134, 125–126. 1994.
- [41] HEYNDRIX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., KERSTERS, K., DEVOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N., AND BERKELEY, R. C. W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvificiens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ahs *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvificiens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.46, 270–279. 1996.
- [42] ALIPPI, A. M., ALBO, G. N., LENIZ, D., RIVERA, I., ZANELLI, M., AND ROCA, A. E. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control of American foulbrood in honey bees. **J. Apic. Res.** v.38, 149–158. 1999.
- [43] SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**. v.313, 1072–1077. 2006.
- [44] NESTLÉ. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS, Disponível em: www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?download=M3wBPgDB/8ull6Du36WenojQ1NTTjaXZnqWfVpzLhmf> Acesso em: 05 jul. 2007.
- [45] PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- [46] GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.

- [47] FELI, M.A.F. Antibacterianos – Sulfonamidas. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/sulfonamidas2007.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- [48] MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.
- [49] WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 23, n. 4, p.362-384, abril, 2006.
- [50] MERCK, The Merck Index—**An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, Merck, Rahway, NJ, 1989.
- [51] WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.40, ISSUE 7, p. 723-730, abril, 2000.
- [52] MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Campinas-SP, 2007. 197p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. III - Universidade Estadual de Campinas.
- [53] QIANG, Z.; ADAMS, C. Potenciometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**. v.38, ISSUE 7, p.723-730, abril, 2000.
- [54] COMBS, M.T.; KHORASSANI, M.A.; TAYLOR, L.T. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight sulfonamides. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p.301-308, 1999.
- [55] O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 297-319, 1998.

[56] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[57] BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999. Disponível em: <

www.dgv.min-agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório%202006%20divulgação.pdf

> Acesso em: 22 de março de 2007.

[58] ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.

[59] DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. **In: Antimicrobials in foods**. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.

[60] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLMÍ, C.; CURINI, R. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4614-4624, 2004.

[61] MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid-chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85-92, 2004.

[62] MARTEL, A.-C.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, N. 6, p.953-961, 2003.

[63] 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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p.534-541, 2003.

[64] HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, N. 5, p.786-789, 1992.

- [65] WANG, Z.; ZHANG, S.; DING, S.; EREMIN, S.A.; SHEN, J. Simultaneous determination of sulphamethazine and sulphadiazine in a new monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay. **Food Additives e Contaminants**. v.25, p.574-582, maio, 2008.
- [66] TAMOSUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. Comparison of LC and UPLC Coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. **Chromatographia**. v.67, p. 783-788, set, 2008.
- [67] GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A.M.M.; RABONE, F.; SALERMO, A.G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 116-119, jan, 2008.
- [68] ZOU, Q.-H; WANG, J.; WANG, X.-F; LIU, Y.; HAN, J.; hou, f.; xie, m.-x. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal AOAC International**, v.91, p.252-257, jan, 2008.
- [69] BISWAS, A.K.; RAO, G.S.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MALIK, J.K. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8845-8850, 2007.
- [70] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.
- [71] LAMBA, S.; SANGHI, S.K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.110-115, 2005.
- [72] PANG, G.-F.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; JIA, G.-Q; FAN, C.-L.; LI, X.-M.; LIU, Y.-M.; LI, Z.-Y.; SHI, Y.-Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.88, p.1304-1311, maio, 2005.

- [73] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p.259-264, 2005.
- [74] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSA, J.; SNIEGOCKI, T.; GRZEBALSKA, A. Sulfonamides residues in honey. Control and Development of Analytical Procedure. **APIACTA**, v. 38, p.249-256, 2003.
- [75] REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**, V.38, P.23-30, 2003.
- [76] POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p.111-117, 2002.
- [77] HELLER, D.N.; NGOH, M.A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M.H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.39-52, 2002.
- [78] STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamides residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p.37-42, 2000.
- [79] ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 898, p.95-102, 2000.
- [80] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.

- [81] HEERING, W.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAVER, E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v.123, p.2759-2762, 1998.
- [82] GEHRING, T.A; RUSHING, L.G.; CHURCHWELL, M.I.; DOERGE, D.R.; McERLANE, K.M.; THOMPSON JR, H.C. Determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 44, N. 10, 3164-3169, 1996.
- [83] 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, p.1457-1461, outubro, 1996.
- [84] VIÑAZ, P.; ERROZ, C.L.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescent derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.726, 1995.
- [85] PATHY, M. Trace analysis of sulfaquinoxaline in animal tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Vol. 275, 115-125, 1983.
- [86] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation technique for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.36-53, 2007.
- [87] LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, p.1-35, 2004.
- [88] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.68-76, 2001.
- [89] ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos – SP. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2006.

- [90] TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean up procedures and selective detectors. **Journal Chromatography A**, v.823, p.137-146, 1996.
- [91] QUEIROZ, S. C. N.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- [92] MAJORS, R. E. **LC-CG Supplement**. v.8, *maio*, 1998.
- [93] IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba – PR. p.134. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [94] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. **Química Nova**, v.27, n.5, set./out., 2004.
- [95] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ – CGCRE – 008**, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> Acesso em: 24 maio 2007.
- [96] BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.
- [97] RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. Campinas-SP, 96p. Dissertação (mestrado) - Unicamp, 2004.
- [98] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.
- [99] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. London, 1995. Q2A

(CPMP/ICH/381/95). Disponível em: www.eudra.org/emea.html. Acesso em 11 de fev. 2008.

[100] THOMPSON, M.; ELISSON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure App. Chem.**, v.74, p.835-855, 2002.

[101] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals**. Expert Consultation, 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 11 fev. 2008.

[102] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

[103] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

[104] LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76p.

[105] HUBERT, P. et al The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

[106] USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776- 1777, 1995.

[107] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em 26 de out. 2007.

[108] BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

[109] EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods**. Brussels: EUROPEAN COMMISSION, 2004. SANCO/825/00. rev.7. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf>.

Acesso em: 11 fev. 2008.

[110] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora, 2001.

[111] IBGE, Cidades - Prefeituras e Municípios 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>> Acesso em: 23 maio 2008.

[112] GOOGLE EARTH. Disponível em: <www.google.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

[113] SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

[114] SHETH, H.B.; YAYLAYAN, V.A.; LOW, N.H.; STILES, M.E.; SPORNS, P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1125-1130, 1990.

[115] SCHWAIGER, I.; SCHUCH, R. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.** v. 96, p.93, 2000.

[116] CANCHO-GRANDE, B.; FALCÓN, M.S.G.; COMESAÑA, M.R.; GÁNDARA, J.S. Determination of sulfametazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3145-3150, jun. 2001.

[117] INMETRO - INSTITUTO DE QUALIDADE E METROLOGIA. **Expressão da Incerteza de medição**, Rio de Janeiro, Apostila, 2002.

[118] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidande: validation of chromatographic methods**. Rockville: Center for Drug Evaluation

and Research (CDER), 1994. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf. Acesso em 11 de fev. 2008.

[119] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedural Manual**. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

[120] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; SANTOS, T.C.R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p.155-168, 2002.

[121] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, jul./dez., 1994.

[122] DE AMARANTE Jr; O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, São Luís, v.12, n.1/2, p.116-131, 2001.

[123] LEITE, F. In: **Validação em Análise Química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 4^a ed., 2002.

[124] CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.10.

[125] COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp. Campinas, 170 p., 1998.

[126] MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; DIEZ, M.M.; GARCÍA, M.C.M.; GIL, D.B.; CAÑADA-CAÑADA, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in Money simples. **Talanta**, v.73, p.304-313, 2007.

[127] THOMPSON, T.S.; PERNAL, S.F.; NOOT, D.K.; MELATHOPOULOS, A.P.; VAN DEN HEEVER, J.P. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.304-311, 2007.

- [128] LI, H.; KIJAK, P.J.; TURNIPSEED, S.B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: a multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.836, p.22-38, 2006.
- [129] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p.174-181, 2005.
- [130] THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p.168-176, 2005.
- [131] STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A Multiresidue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. **Analytica Chimica Acta**, v.547, p.262-268, 2005.
- [132] SOTO-CHINCHILA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCIA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)]oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p.60-67, 2005.
- [133] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y.-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8468-8473, setembro, 2005.
- [134] MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.64, p.87-100, 2004.

- [135] CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDERIS, B.M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta**, v.494, p.21-28, 2003.
- [136] FUH, M.R.; CHU, S.Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p.215-221, 2003.
- [137] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separations conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v. 98, p.153-158, 2003.
- [138] CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and eggs. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, N. 3, p.558-566, 2003.
- [139] REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.225-232, 2003.
- [140] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.153-158, 2003.
- [141] RHIJI, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A.; BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.121-133, 2002.
- [142] VERZEGNASSI, L.; SAVOY-PERROUD, M.-C.; STANDLE, R.H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.77-87, 2002.

- [143] FUH, M.-R.S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, p.1127-1139, 2001.
- [144] LINDSEY, M.E.; MEYER, M.; THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.73, N. 19, p.4640-4646, outubro, 2001.
- [145] NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C.; BERNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p.169-177, 2000.
- [146] DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p.1243-1247, 2000.
- [147] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [148] REEVES, V.B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.723, p.127-137, 1999.
- [149] KENNEDY, D.G.; McCRAKEN, R.J.; CANNAVAN, A.; HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p.77-98, 1998.
- [150] CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M.E.; DIMARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal of Chromatography B**, v. 706, p.269-277, 1998.

- [151] AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.1-40, 1995.
- [152] KRISTLANSEN, G.K.; BROCK, R. Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. **Analytical Chemistry**, v.66, N. 19, p.3253-3258, outubro, 1994.
- [153] NIESSEN, W.M.A.; USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. **Analyst**, v.119, p.2543-2548, dezembro, 1994.
- [154] PORTER, S. Confirmation of sulfonamides residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, v.119, p.2753-2756, 1994.
- [155] SHETH, H.B.; SPORNS, P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.1696-1700, 1991.
- [156] UMAGAT, H.; McGARRY, P.F.; TSCHERNE, R.J. Stability indicating sulfa drug analysis using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, N. 7, p.922-924, 1979.

9. ANEXOS



9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Quadro 01 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel – PNCR/2007.

Grupo	Analito	Matriz	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR/NA* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	Mel	CLAE/UV	25	200	7
	Oxitetraciclina (a)					
	Tetraciclina (a)					
	Sulfatiazol (b)	Mel	CLAE/UV	25	100	15
	Sulfadimetoxina (b)					
	Sulfadiazina					
	Sulfaquinoxalina					
	Sulclorpiridazina	Mel	CL/EM-EM	0,5	1(I)*	30
	Nitrofurazona – SEM					
	Furazolidona – AOZ					
	Furaltadona – AMOZ					
	Nitrofurantoina - AHD					
	Tilosina	Mel	CL/EM-EM	0,5	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	Mel	CG/EM-EM	10	10	15
	Alfa-endosulfan			10	10	
	4,4-DDE			10	10	
	4,4-DDD			10	10	
	4,4 DDT			10	10	
	Dodecacloro			10	10	
	Endrin			10	10	
	Iprodiona			50	50	
	Tetradifona			20	20	
	Captana			50	50	
	Lindane			10	10	

Fonte: BRASIL [57].

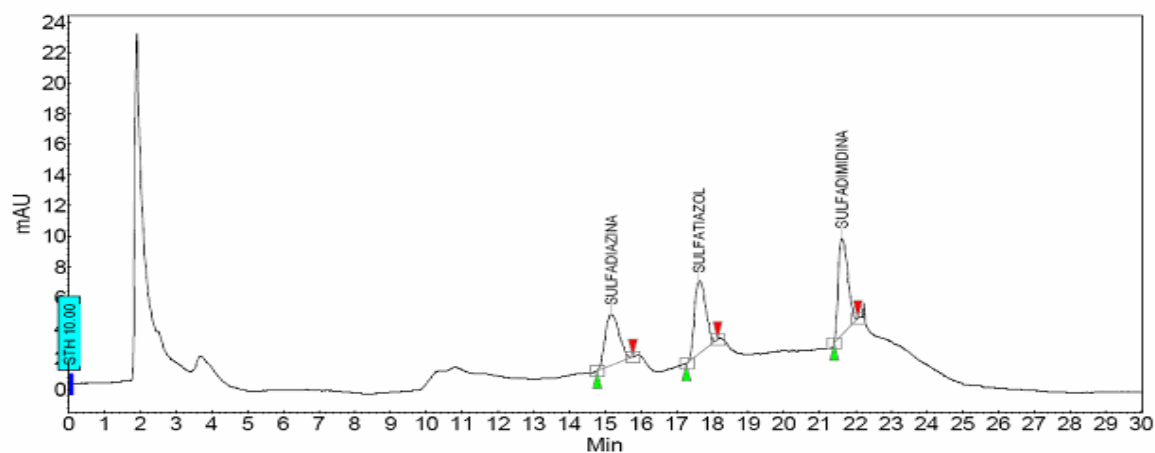
9.2 ANEXO 2

Quadro 02 – Distribuição dos valores do teste “*t*” de Student

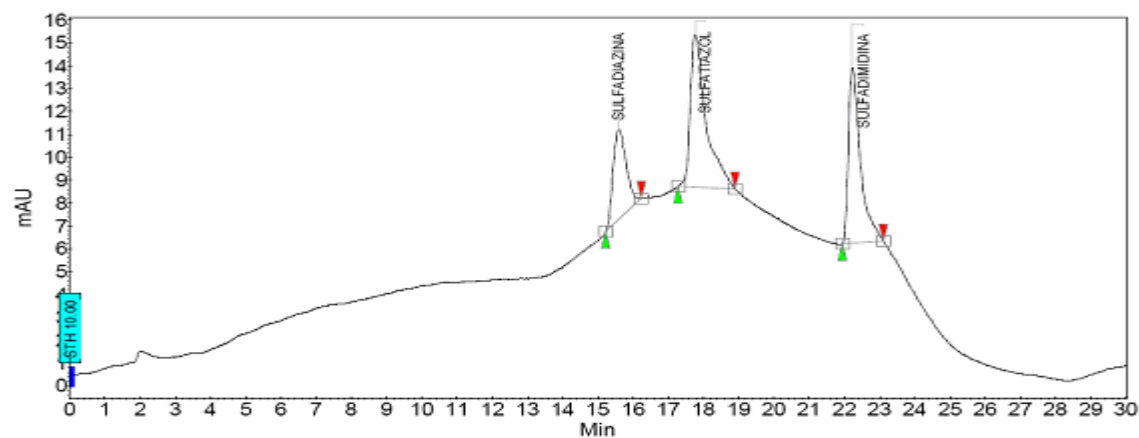
GL (n)	t _{95%}
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086

Fonte: Instituto de Qualidade e Metrologia [2002].

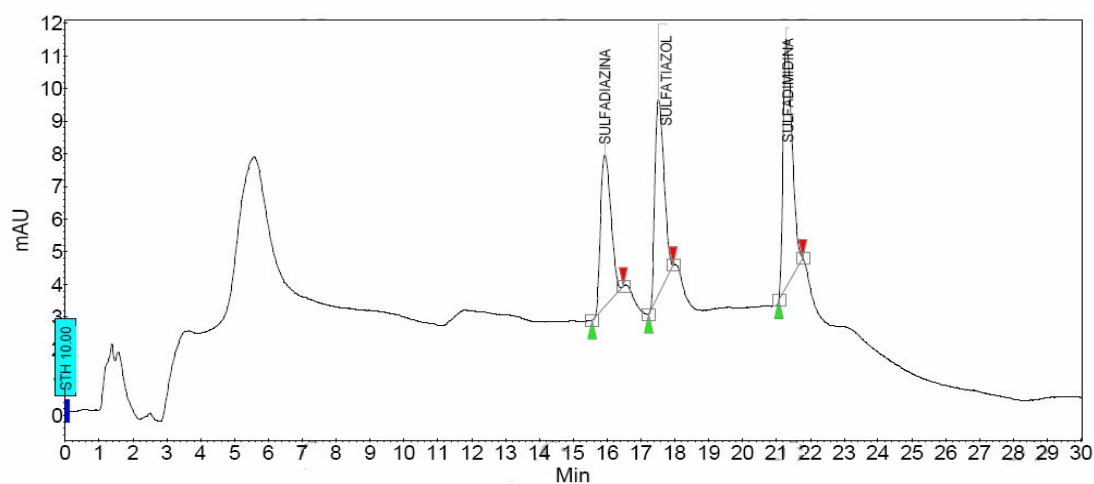
9.3 CROMATOGRAMAS DOS TESTES DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL



(a)

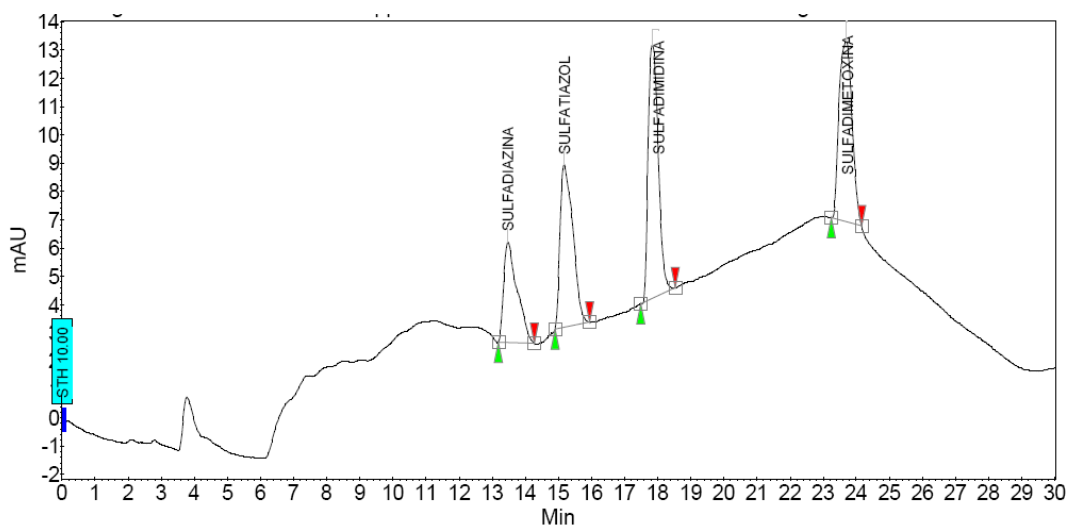


(b)

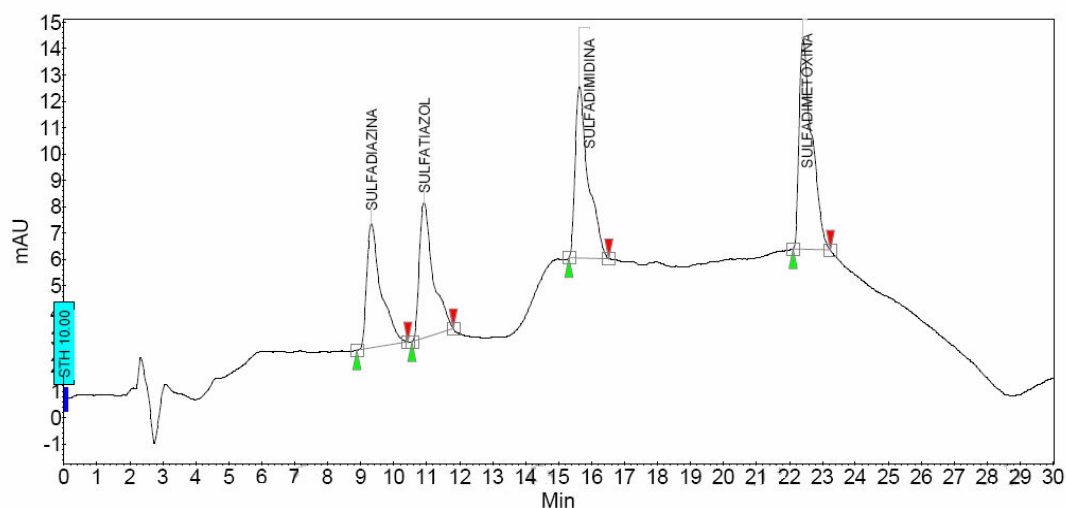


(c)

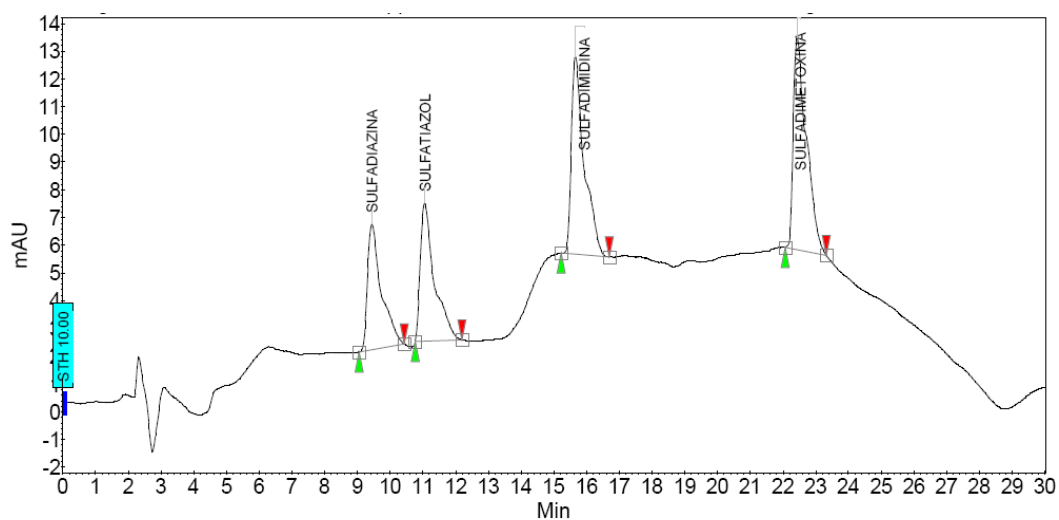
Figura 35 -Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5/Metanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 36 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

São Luís
2008

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco

São Luís
2008

Silva, Verônica Alves Gonçalves da

Desenvolvimento de metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos/ Verônica Alves Gonçalves da Silva. São Luís, 2008.

130f.

Orientador: Teresa Cristina R. dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Química. São Luís, 2008.

1. Mel – resíduos de sulfonamidas. 2. Produção de mel. 3. Extração em fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina R. dos Santos, orient. II. Título.

CDU 658.56:638.14.06

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^ª. Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco
(Orientadora)**

**Prof^º Dr. Laerte da Cunha Azeredo
(DEQUI/UFRRJ)**

**Prof^º Dr. Fernando Carvalho
(DETEQUI/UFMA)**

A Deus e a Nossa Senhora...

Aos meus pais: Maria da Penha Alves da Silva
e Êulete Gonçalves da Silva.

Ao meu amor, Fábio Silveira Vidal.

À minha sobrinha: Iracema D'monik Miranda
Gonçalves da Silva.

E ao meu irmão Fabrício C. G. da Silva.

Por todo amor, carinho e paciência.

E pelo incansável incentivo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos memoráveis, coisas inexplicáveis e pessoas inesquecíveis”.

Ao nosso Deus, Todo Poderoso, meu Mestre, meu Pastor, meu Senhor, por ter me dado coragem para superar todas as dificuldades, por nunca me desamparar!... A Nossa Senhora, que tanto me inspira, em todos os momentos, tirando-me de todas as dificuldades e levando-me a serenidade.

Aos meus pais, que me fornecem a força necessária para tudo na minha vida, por terem me educado tão bem, ensinando-me valores essenciais para ser uma boa pessoa e uma profissional consciente e de muita ética. Agradeço ao meu pai pelo exemplo de pessoa culta e a minha mãe pelo exemplo de professora dedicada. Agradeço também à valiosa lição de sempre me mostrarem que sozinhos não somos nada, mas somos muito mais com a ajuda dos amigos.

Aos meus tios, tia Cida e tio Laerte, por desde cedo me ensinarem a amar a química e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada também por me ensinarem a superar obstáculos estudando.

Ao meu noivo Fábio Silveira Vidal, que tão pacientemente ouviu todas as minhas dúvidas, afagou minhas tristezas, pelo carinho, pelo companheirismo, pelas horas que passou comigo estudando química e pelo seu generoso amor que tanto me incentivou em todas as atividades sempre acreditando que eu iria conseguir.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, por me acolher tão carinhosamente, por seu incentivo durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório NARP pela convivência.

Ao amigo, José Crediciomar pelo apoio, incentivo, paciência (para me ensinar a utilizar o equipamento (HPLC)) e pela grande demonstração de amizade.

Aos meus amigos: Gilvan, Raphael e Álvaro, amigos que fiz e aonde quer que eu vá levarei em meu coração. Agradeço a cumplicidade e agradável convívio, as conversas e os bons momentos compartilhados. Raphael te agradeço mais ainda pela grande ajuda na finalização desta pesquisa, muito obrigada meu amigo!

A querida amiga e bibliotecária, Rosivalda Pereira, pela acolhida fantástica, pelas adoráveis e produtivas conversas na biblioteca do CCET e pela grande ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

A amiga Cláudia Guerra pela convivência, pelo carinho, amizade e por ser minha família em São Luís.

Ao Prof^o José Wilson pela amizade e orientação profissional, desde a disciplina de catálise continuando seus ensinamentos por todo o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química: Marise e Daniele, aos funcionários do Departamento de Tecnologia Química: Alba, Ivaldo e de outros setores da UFMA, em especial a Dona Eunice e Senhor Alberto, pela constante disposição em me ajudar na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“A pesquisa científica consiste em
ver o que todo mundo já viu, mas
pensar em algo que ninguém pensou
ainda”.*

(Albert Szent-Györgyi)

RESUMO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável, não sendo permitido a presença de aditivos e/ou agentes conservadores. Na apicultura as sulfonamidas são muito utilizadas na prevenção e controle de doenças em colméias, como a cria pútrida americana causada pelo *Paenibacillus larvae*. Uma consequência desta prática é a presença destes resíduos no mel, o que pode causar reações alérgicas nos consumidores. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas no mel. No Brasil, a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A realização de programas de monitoramentos de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando possíveis danos à saúde do consumidor. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico multiresidual para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel de abelhas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A metodologia estabelecida consistiu nas seguintes condições: extração em fase sólida com sorvente Nexus, eluição com 5 mL de acetonitrila e reconstituição com solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, com adição de 1% de metanol, separação em coluna analítica C18, fase móvel acetonitrila e água, no modo de eluição em gradiente e detecção a 278 nm. O preparo de amostra consistiu na hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} de uma alíquota de mel e ajuste para pH 4,5 com solução tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. O método foi validado e os resultados demonstraram exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Foi encontrada boa faixa de linearidade, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 41 a 89% e estimativa do desvio padrão relativo variando entre 2,36 e 14% para os quatro compostos estudados. Os limites de detecção das quatro sulfas em amostra de mel variaram de 20 a $30 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 60 a $90 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para as concentrações totais de SDZ, STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite adequada determinação das quatro sulfas em amostras de mel de abelhas.

Palavras-chave: Sulfonamidas. CLAE-DAD. Extração por fase sólida. Validação. Mel.

ABSTRACT

Honey is a natural substance produced by bees and by your nature it is considered a healthy product. Presence of additives and/or preserve agents is not permitted. On apiculture, sulfonamides are largely used on prevention and control of beehive disease, such as American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. A consequence of this practice is the presence of these residues in honey, that should cause allergy reactions on consumers. In the last years, some published works is discussing the presence of antibiotic and sulfonamides residues in honey. In Brazil, the presence of antibiotics residues in food is controlled by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and by the Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). The realization of monitoring contaminants residues in food programs, as well as the Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) from MAPA are essentials to the sanitary vigilance actions development, preventing and controlling possible hazard to the consumer health. This work has the objective the development and validation of multiresidue analytical method to the sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidine and sulfadimethoxine determination in bee honey using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). The established methodology consisted on such conditions: solid phase extraction with Nexus sorbent, elution with acetonitrile 5 mL, and reconstitution with sodium acetate buffer (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5, with 1% methanol addition, separation on analytical column C18, acetonitrile and water mobile phase, on gradient elution mode and detection on 278 nm. The sample preparation consisted on the acid hydrolysis with hydrochloric acid 2 mol L⁻¹ of a honey rate and adjust to pH 4,5 with sodium acetate buffer solution 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5. The method was validated and the results demonstrated accuracy and precision between the limits established by the current legislation. Good linearity range was encountered, obtaining recovery values varying from 41 to 89% and relative standard deviation estimative varying between 2,36 and 14% to the four studied compounds. The four sulfonamides detection limits in honey sample varying from 20 to 30 µg kg⁻¹ and the quantification limits varied from 60 to 90 µg kg⁻¹. Considering 100 µg kg⁻¹ the residue maximum limit established by the Brazilian legislation to the SDZ, STZ, SMZ and SDM total concentration, the described method permit suitable determination of the four sulfonamides in bee honey.

Keywords: Sulfonamides. HPLC-DAD. Solid phase extraction. Validation. Honey.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 2	Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.....	45
Quadro 3	Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.....	49
Quadro 4	Testes para seleção da composição da fase móvel.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição típica do mel.....	24
Tabela 2-	Propriedades gerais das sulfonamidas.....	27
Tabela 3-	Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.....	38
Tabela 4-	Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.....	64
Tabela 5-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	67
Tabela 6-	Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.....	74
Tabela 7-	Estudo da composição da fase móvel.....	80
Tabela 8-	Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.....	83
Tabela 9-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	87
Tabela 10-	Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)....	90
Tabela 11-	Resultados dos testes de eficiência de extração.....	91
Tabela 12-	Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.....	93
Tabela 13-	Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 14-	Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão.....	97
Tabela 15-	Parâmetros de validação para o método desenvolvido.....	98
Tabela 16-	Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.....	100
Tabela 17-	Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.....	102
Tabela 18-	Análise de amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de mel no Brasil.....	23
Figura 2	Diferentes tipos de mel.....	24
Figura 3	Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas: (a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.....	26
Figura 4	Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida)...	27
Figura 5	Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.....	28
Figura 6	(a) Esquema de cartucho para EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.....	44
Figura 7	Principais etapas empregadas EFS.....	45
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.....	50
Figura 9	Processo de fortificação das amostras.....	54
Figura 10	Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.....	59
Figura 11	(a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.....	60
Figura 12	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.....	63
Figura 13	Procedimentos experimentais empregados nas etapas de extração EFS.....	69
Figura 14	Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.....	72
Figura 15	Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.....	75
Figura 16	Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatógrafo: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm.....	76
Figura 17	Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, 1,0 mg L ⁻¹ , usando C ₁₈ (cromatograma vermelho), C ₈ (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).....	77
Figura 18	Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto).....	78
Figura 19	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água.....	81

Figura 20	Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,5.....	82
Figura 21	Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L ⁻¹	84
Figura 22	Estudo da degradação das soluções-padrão.....	84
Figura 23	Esquema da reação açúcar-sulfonamida.....	86
Figura 24	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , sem hidrólise ácida.	88
Figura 25	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , com hidrólise ácida.	89
Figura 26	Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de <i>clean-up</i>	92
Figura 27	Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹	93
Figura 28	Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.....	95
Figura 29	Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).....	96
Figura 30	Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de 100 ng g ⁻¹	100
Figura 31	Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá	102
Figura 32	Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.....	103
Figura 33	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins.....	103
Figura 34	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí.....	103
Figura 35	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L ⁻¹) pH 4,5/Metanol.....	129
Figura 36	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
C8	Fase estacionária do tipo octilsilano
CODEX	<i>Codex Alimentarius</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido com detector por arranjo de fotodiodos
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
CL	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida - EFS)
t _R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Detector por absorbância no ultravioleta-visível

LISTA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
STZ	Sulfatiazol
SAD	Sulfanilamide
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SID	Sulfisomidina
SMTX	Sulfametoxazol
SDM	Sulfadimetoxina
SBM	Sulfabenzamida
SDX	Sulfadoxina
SQX	Sulfaquinoxalina
SME	Sulfameter
SMX	Sulfamoxol
SMP	Sulfametoxipiridazina
SCP	Sulfacloropiridazina
SSZ	Sulfasalazina
SMDZ	Sulfametoxidiazina
SMTT	Sulfametiltiazol
SMM	Sulfamonometoxina
SAI	Sulfisoxazol
SCT	Sulfacetamida
SGN	Sulfaguanidina
SMT	Sulfametizol
STR	Estreptomicina
DHS	Diidroestreptomicina
CAP	Cloranfenicol
OTC	Oxitetraciclina
AMP	Ampicilina
TC	Tetraciclina
DMC	Democlociclina
CTC	Clorotetraciclina
NEO	Neomicina
PENG	Penicilina G
SPI	Espiramicina
DC	Doxiciclina
PEN	Penetamato
DES	Desmicosina
OLE	Oleandomicina
TIL	Tilmicosina
TYL	Tilosina
OXA	Oxacilina
EA	Eritromicina
CLOX	Cloxacilina
NAF	Naficilina
DIC	Dicloxacilina
ROXI	Roxitromicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µ	Micron
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	Minuto
sec	Segundo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
R ²	Coeficiente de Determinação ou de Correlação Múltipla ou Eficiência da Regressão
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Amostral
t	t de <i>Student</i>
$\bar{X}$	Média aritmética
x _i	Valor Medido
Σ	Somatório
√	Raiz quadrada
σ	Desvio padrão da população

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	22
1.1.1	Características físico-químicas do mel.....	23
1.1.2	Doenças nas abelhas e na colméia.....	25
1.2	SULFONAMIDAS.....	26
1.2.1	Resíduos de sulfonamidas no mel.....	29
1.2.2	Aspectos da legislação.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS.....	35
3.1	PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	43
3.1.1	Extração por Fase Sólida (EFS).....	43
4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.1	FAIXA DE APLICAÇÃO.....	49
4.2	LINEARIDADE.....	51
4.3	SELETIVIDADE.....	51
4.4	PRECISÃO.....	52
4.4.1	Repetitividade.....	52
4.4.2	Precisão intermediária.....	53
4.4.3	Reprodutibilidade.....	53
4.5	EXATIDÃO.....	53
4.5.1	Recuperação.....	54
4.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	55
4.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	56
5.	MATERIAIS E MÉTODO.....	58
5.1	METODOLOGIA.....	58
5.1.1	Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas.....	58
5.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	60

5.2.1	Padrões.....	60
5.2.2	Reagentes e Solventes.....	60
5.2.3	Dispositivos para Extração por Fase Sólida.....	60
5.2.4	Coluna Cromatográfica.....	61
5.2.5	Equipamentos.....	61
5.2.6	Outros materiais.....	62
5.3	MÉTODO.....	62
5.3.1	Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas.....	63
5.3.1.1	Seleção da coluna.....	64
5.3.1.2	Linha de Base do Solvente.....	64
5.3.1.3	Conformidade do Sistema.....	64
5.3.1.4	Seleção do Comprimento de onda.....	65
5.3.1.5	Seleção da fase móvel.....	65
5.3.1.6	Preparação dos padrões.....	65
5.3.2	Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração.....	66
5.3.2.1	Pré-tratamento da amostra.....	66
5.3.2.2	Seleção do adsorvente.....	67
5.3.2.3	Condicionamento dos cartuchos.....	67
5.3.2.4	Eluição dos analitos.....	68
5.3.2.5	Extração por EFS.....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	69
5.4.1	Seletividade.....	70
5.4.2	Linearidade.....	70
5.4.3	Limites de Detecção e de Quantificação.....	70
5.4.4	Estudo de recuperação.....	71
5.4.4.1	Precisão.....	71
5.4.4.2	Exatidão.....	71
5.5	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1	SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	74
6.2	SELEÇÃO DA COLUNA.....	77
6.3	SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	77
6.3.1	Seleção do pH da fase móvel.....	78

6.3.2	Composição da fase móvel.....	79
6.3.3	Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho.....	82
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	83
6.5	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS.....	85
6.5.1	Pré-tratamento da amostra.....	85
6.5.2	Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração em fase sólida.....	90
6.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	94
6.6.1	Conformidade do sistema.....	94
6.6.2	Seletividade.....	95
6.6.3	Curva analítica.....	96
6.6.4	Faixa linear, linearidade, sensibilidade.....	97
6.6.5	Limites de detecção e quantificação.....	97
6.6.6	Precisão e Exatidão.....	98
6.6.6.1	Precisão.....	98
6.6.6.2	Exatidão.....	99
6.6.6.3	Avaliação estatística do método.....	101
6.7	ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	101
7.	CONCLUSÃO.....	106
8.	REFERÊNCIAS.....	108
9.	ANEXOS.....	127
9.1	ANEXO 1.....	127
9.2	ANEXO 2.....	128
9.3	ANEXO 3.....	129

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável. A adição de aditivos e agentes conservadores no mel não é permitida. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas em mel. Antibióticos são principalmente usados na apicultura para o tratamento de doenças bacterianas ou outros tipos de doenças infecciosas [1].

Para aceitação do produto apícola, no Brasil, é necessário que o produto obedeça ao regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A legislação vigente é descrita na Instrução Normativa N. 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [2]. A citada norma define tipos de mel, procedimento de obtenção, apresentação e/ou processamento, além de estabelecer limites para os dez principais parâmetros físico-químicos, importantes na avaliação da pureza, maturidade e possível adulteração do mel.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro no mercado externo, é necessário que o produto cumpra as exigências estabelecidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), mais especificamente do Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM [3]. O programa visa atender às exigências do mercado externo, em especial da Comunidade Européia, responsável por mais de 90% da exportação de mel brasileiro e estabelece, dentre outras coisas, a avaliação quanto à presença de resíduos no produto, o potencial da utilização inadequada de drogas no produto e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas. Várias classes de substâncias tóxicas são incluídas neste programa, mais especificamente organoclorados, antibióticos, metais pesados, substâncias promotoras de crescimento, tireostáticos e sulfonamidas.

A ausência de controle de resíduos no mel brasileiro foi a principal justificativa para o embargo ocorrido em 2006 na União Européia [4]. Uma das grandes preocupações do mercado apícola atual é a eliminação total de resíduos de antibióticos e defensivos agrícolas no mel. Utilizados para prevenir e tratar enfermidades nas abelhas e doenças de origem bacteriana na colméia fora da época de florada, os antibióticos, se utilizados sem o devido controle, podem causar prejuízos a qualidade do mel. A restrição do comércio internacional baseia-se no fato de que tais substâncias poderiam atingir o consumidor, que estaria ingerindo o mel contaminado, acarretando danos à sua saúde, tais como, adaptação e resistência de

bactérias no organismo. Por este motivo é que, recentemente, alguns países compradores de mel têm incluído em suas exigências um produto apícola livre de antibióticos.

Embora o uso de antibióticos em colméias seja uma prática constante dos apicultores, o Brasil possui um grande diferencial no contexto mundial, visto que existem poucos registros de doenças comuns em abelhas, principalmente na região Nordeste.

Sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, na apicultura, são utilizadas no tratamento e prevenção da “cria pútrida” em abelhas, doença provocada pelo *Paenobacillus larvae*. Uma consequência direta do uso é a ocorrência de resíduos de sulfonamidas no mel de abelhas, o que compromete a qualidade do produto [5].

Estudos para estes compostos incluem procedimentos colorimétricos como a reação de Bratton-Marshall [6;7]; cromatografia em camada delgada (CCD) [8], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) [9, 10; 11; 12; 13; 14; 15 e 16, dentre outros], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) [17; 18; 19; 20 e 21, dentre outros] espectrometria de massas no modo “tandem” (CLAE-EM ou CLAE-EM/EM) [22; 23; 24; 25; 26; 27 e 28, dentre outros].

A literatura atualmente disponível para análise de sulfonamidas em mel ressalta a especificidade da matriz com relação à aplicação de métodos analíticos. No Brasil, existem poucos trabalhos com sulfonamidas em mel. A disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos apícolas, quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, é essencial para fornecer aos apicultores garantias sobre a qualidade de seu produto, garantindo-lhes condições de exportar. Pelo exposto é que veio o interesse em fazer esta pesquisa. Este trabalho também poderá ser utilizado como um incentivo na realização de novos estudos envolvendo sulfonamidas em alimentos (matrizes diferentes de mel).

1.1 MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS

O Brasil tem um grande potencial apícola, devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variedade edafoclimática existente, o que possibilita produzir mel o ano todo [29]. A apicultura é uma atividade que se enquadra no tripé da sustentabilidade podendo favorecer programas de desenvolvimento econômico, social e ecológico como os existentes no Nordeste brasileiro. Em 2004 o Brasil alcançou a posição

de 11º produtor mundial de mel (40 mil toneladas) e o 5º exportador mundial (21 mil toneladas). No cenário mundial, os principais produtores de mel são China, Estados Unidos e Argentina e os maiores exportadores são China, Argentina, México e Alemanha. No Mercosul, o Brasil é superado apenas pela Argentina. A produtividade brasileira ainda é baixa [3].

Dos produtos apícolas o mel é o que tem maior destaque para o comércio. A região Sul é a principal região produtora de mel no país com 47,72%. A região Nordeste vem na segunda posição com 31,58% da produção, seguida das regiões Sudeste (16,22%), Centro-Oeste (2,87%) e Norte (1,62%) [3].

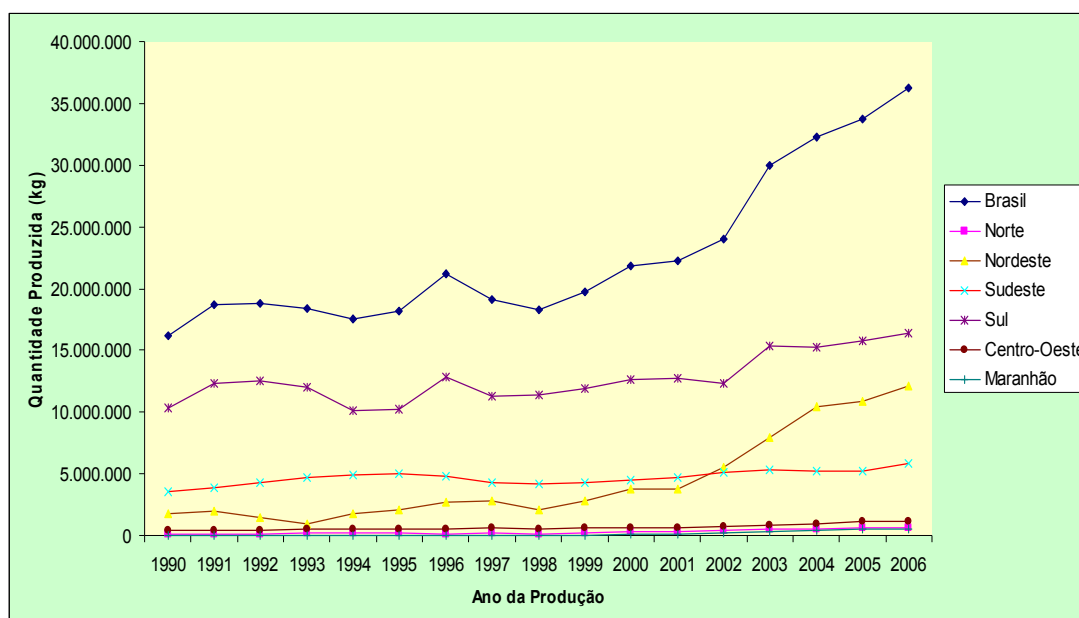


Figura 1 – Produção de mel no Brasil.

Fonte: adaptado de [30]

Segundo dados do IBGE [31] o Maranhão, no ano de 2005, passou a ocupar a 10ª posição no *ranking* nacional, tendo alcançado um aumento de produção de 289 % em relação à estatísticas realizadas pelo mesmo órgão no ano de 2001, comprovando-se o grande potencial de produção do estado.

1.1.1 Características físico-químicas do mel

O mel (Figura 2) é um produto biológico muito complexo, devido a sua composição variar com a flora e ser influenciado pelas condições climáticas e edafológicas da

região onde foi produzido [32]. Segundo Crane [33] mel é o resultado da desidratação e transformação do néctar, portanto a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar.



Figura 2- Diferentes tipos de mel.

Fonte: Internet: [34]

A composição físico-química do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais também estão diretamente relacionados com a fonte do néctar que o originou e assim como com a espécie da abelha que o produziu [32]. A Tabela 1 apresenta uma visão geral da composição química do mel.

Tabela 1 - Composição típica do mel.

Componente	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76-1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 -40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020-1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	----
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68-59,49	10,33
Proteína (%)	0,1686	0,0577-0,567	7,09

Fonte: NATIONAL HONEY BOARD [35].

Sabor e aroma. O sabor e aroma característicos do mel são conferidos pela presença dos compostos voláteis. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado

diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-los dos favos [36]. Os aromas podem ser classificados em característico, adocicado, floral, cera e queimado. Já o sabor pode ser classificado como característico, adocicado, floral, cera, queimado, ácido e residual.

Cor. “A coloração do mel” é normalmente interpretada como algo mais escuro que creme e mais claro que marrom. A cor do mel líquido pode realmente variar de branco-aquoso a próximo de preto, com variantes tendendo para matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul [33].

Água. O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% [37]. Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. A quantidade de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade [32].

Açúcares. O poder adoçante do mel é avaliado em cerca da metade do atribuído ao mesmo peso de açúcar de cana [33]. Além da doçura, os açúcares são responsáveis por outras características, tais como: capacidade de conservação, poder higroscópico e habilidade de promover cor e sabor [38]. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5% a 40% para a glicose e de 36,2% a 49,6% para a frutose, de acordo com a florada [39].

Diversos. Outros componentes importantes presentes no mel são as enzimas, os aminoácidos, os ácidos orgânicos e minerais.

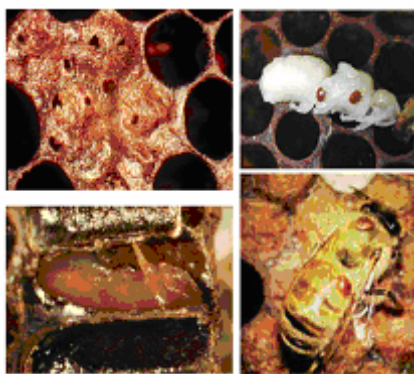
1.1.2 Doenças nas abelhas e na colméia

Assim como em seres humanos as abelhas são susceptíveis a numerosas enfermidades, necessitando de tratamentos adequados à base de fármacos como as sulfonamidas para prevenção e/ou tratamento destas. Na Figura 3 são apresentadas as doenças que mais afetam abelhas e colméias. Dentre as enfermidades que mais as afetam está a cria pútrida.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (*American Foulbrood*), é produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas [40; 41]. O tratamento ocorre pela administração dos antibióticos na água ou através de alimentação artificial contendo a medicação, geralmente administrada, antes da florada [42].

Este tipo de doença quando acontece é capaz de dizimar dezenas de colméias, sendo uma enfermidade muito temida pelos apicultores.

O Brasil tem se destacado no cenário internacional por ter praticamente erradicado esta doença. A grande questão que envolve doenças na apicultura, assim como em outras atividades produtoras de alimentos, é a utilização de fármacos na prevenção ou tratamento destas. As sulfonamidas são compostos que podem ter sua ação prolongada por muito tempo dependendo do tipo de matriz a qual ela está presente [43]. O uso inadequado de fármacos na prevenção ou controle de doenças na colméia pode acarretar danos a qualidade do produto e causar problemas na saúde do consumidor, uma vez que a contaminação do mel com resíduos de sulfonamidas numa colméia mantém-se durante anos.



(a)

(b)

Figura 3 – Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas:
(a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.
Fonte: Internet: [44]

1.2 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, tendo sido desenvolvidas em 1935, pelo cientista Gerhard Domagk [45]. São compostos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Figura 4). Sua classificação é realizada com base no grau de absorção pelo trato gastrointestinal e através da duração de seu efeito [46].

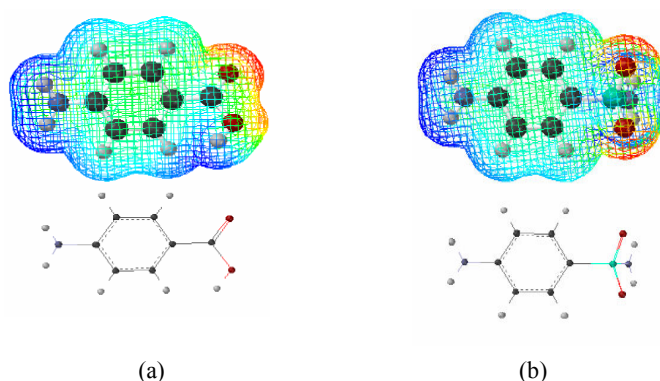


Figura 4 - Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida).
 Fonte: Internet: [47]

Possuem ação bacteriostática e atuam competindo com o ácido *p*-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico, agindo de forma sistêmica, com ação de curta ou longa duração, dependendo do tipo [48].

Os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana das sulfonamidas estão reunidos na própria molécula da sulfanilamida. O grupo – SO₂NH₂ não é essencial em si, mas tem a importante característica do enxofre estar diretamente ligado ao anel benzênico [48].

Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, *pKa*, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica [48].

Quimicamente, as sulfonamidas são ácidos fracos, relativamente insolúveis em água, que apresentam *pKa* variado e são iônicas por natureza [49]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas relevantes das sulfonamidas em estudo nesta pesquisa.

Tabela 2 – Propriedades gerais das sulfonamidas.

Composto	CAS- Number	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)*	Sol. em H ₂ O* (mg /100 mL)	Log K _{ow}	<i>pKa</i>
Sulfadiazina	[68-35-9]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.26	13	0,12 ^b	6,50
Sulfadimetoxina	[122-11-2]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1	1,4 ^a	6,21
Sulfadimidina	[57-68-1]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	272.33	192	0,25 ^a	7,45
Sulfatiazol	[72-14-0]	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.32	1	--	7,24

Fonte: *[50] ; ^a [27]; ^b [51]

A solubilidade das sulfonamidas varia muito em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional. Em meios alcalinos a solubilidade é maior que em pH neutro e ácidos, aumentando em meio ácido de sais sódicos [52].

Em sua molécula as sulfonamidas contêm um grupo amina básico (-NH_2) e um grupo amida ácido (-NH-) que correspondem ao $\text{p}K_{a1}$ e $\text{p}K_{a2}$, respectivamente; apresentando caráter anfótero, ou seja, em soluções básicas o comportamento das sulfonamidas é ácido, devido ao N1 (nitrogênio ácido, que apresenta capacidade de doar prótons), já em soluções ácidas o comportamento das sulfonamidas é básico, devido ao N4 (nitrogênio básico - que apresenta capacidade de captar prótons). A completa ionização é conseguida quando o pH do analito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de $\text{p}K_a$, para compostos ácidos e básicos, respectivamente [53].

Na Figura 5 é apresentado um esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio. Em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

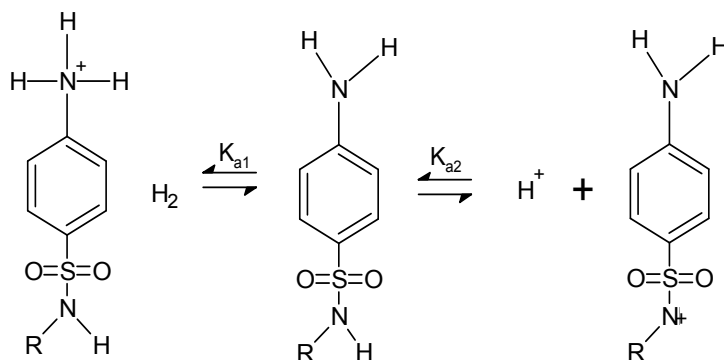
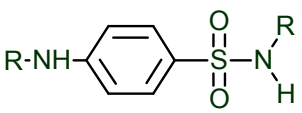
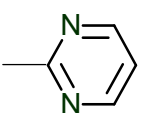
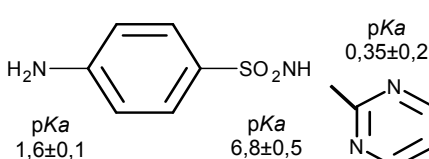
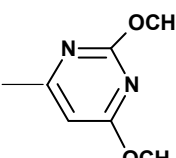
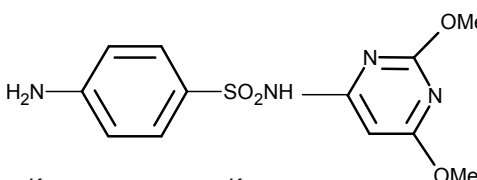
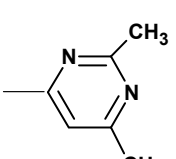
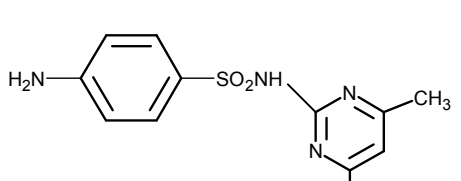
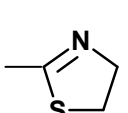
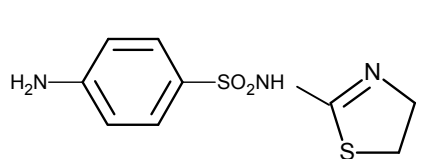


Figura 5 – Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.
Fonte: [53]

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares das sulfonamidas selecionadas para este estudo, bem como as variações dos valores de $\text{p}K_a$ dos respectivos grupos funcionais das sulfonamidas.

Fórmula Geral das Sulfonamidas		
		
Sulfonamida	Radical	Estrutura Completa
Sulfadiazina (SDZ)		 pK_a 1,6±0,1 pK_a 6,8±0,5 pK_a 0,35±0,2
Sulfadimetoxina (SDX)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfadimidina (SDD)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfatiazol (STZ)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5

Quadro 1 – Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo
 Fonte: adaptado de [51], [54] e [23].

1.2.1 Resíduos de sulfonamidas no mel

No que se refere à saúde pública, o monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos vem-se tornando um assunto cada vez mais discutido em nível mundial [51]. Uma grande variedade de fármacos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses,

os das classes: sulfonamidas, betalactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos [55].

Atualmente, grandes volumes de mel são solicitados por mercados internacionais, fazendo com que novas práticas apícolas sejam implantadas a fim de garantir que a produção esteja protegida de possíveis ataques de pragas, doenças ou contaminações [3].

A utilização de fármacos na prevenção e/ou tratamento de doenças na colméia é prática comum entre os apicultores. Resíduos de sulfonamidas podem ocorrer no mel como consequência da utilização destes fármacos no tratamento de doenças de origem bacteriana. A presença de resíduos de sulfonamidas no mel não é desejável, uma vez que o mel é um produto natural e saudável e que, como tal, não deve apresentar substâncias comprovadamente tóxicas.

As exposições de humanos a doses de resíduos de fármacos podem gerar possíveis efeitos prejudiciais à saúde do consumidor. Os efeitos mais comumente encontrados são reações alérgicas, desordens na flora intestinal e possível impacto da resistência de antimicrobianos utilizados em terapia humana. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se, ainda, que aproximadamente 5% dos pacientes humanos tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [56]. Deve-se salientar, entretanto, que ainda não existem evidências científicas demonstrando que esta associação seja decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [57].

1.2.2 Aspectos da legislação

Visando proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores em saúde pública estabeleceram níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) quanto à presença de fármacos em alimentos de origem animal [57]. O LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduo com o qual não ocorra perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) [52].

No Brasil, o Ministério da Saúde é quem estabelece os LMR e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os responsáveis pelas ações fiscais de vigilância do uso de fármacos em alimentos.

Na produção de produtos de origem animal o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do MAPA. O PNCR tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do mel e de outros produtos de origem animal, no território nacional, bem como o aporte dos produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas aos conhecimentos das violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais. Para isto, são colhidas amostras dos alimentos, junto aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) [57].

O LMR de sulfonamidas em mel fixado pelo PNCR é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina (Quadro 01, ANEXO 1).

A ANVISA, recentemente, vem implantando um Programa de Análise de Resíduos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) para diversos tipos de alimentos (leite, carnes, ovos e mel de abelhas), cujo objetivo é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária [58].

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

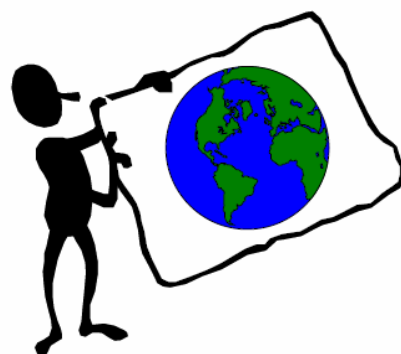
2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para determinar sulfonamidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Comparar diferentes tipos de processos de extração/pré-concentração de sulfonamidas, utilizando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de méis;
- Divulgar a problemática envolvendo a presença de fármacos em alimentos.

3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS



3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que procedimentos de controle de qualidade de alimentos sejam realizados a fim de verificar a presença de resíduos de sulfonamidas e outros contaminantes. O desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença destes resíduos em diferentes matrizes alimentícias tornam-se fundamentais [52]. Segundo Davidson e Branem [59], o monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de medicamentos veterinários tem aumentado devido à importância da repercussão em saúde pública.

A determinação de resíduos de sulfonamidas envolve quantificação de concentrações muito baixas, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. As técnicas analíticas mais comumente usadas para a quantificação destes resíduos são as cromatográficas, associadas a diferentes sistemas de detecção, tais como UV, arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas [52].

A cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos tem sido utilizada com êxito para determinar vários resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal [18]. Embora atualmente muitos métodos confirmatórios como, o CLAE-EM/EM, para a determinação de sulfonamidas em alimentos sejam citados na literatura, estes tipos de determinação requerem o uso de equipamentos caros sendo, portanto, de menor disponibilidade na maioria dos laboratórios de química, principalmente em universidades [60].

A análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento, extração e/ou *clean up* da amostra [49] devido à necessidade de separar, de uma matriz orgânica complexa, compostos em concentrações bastante baixas, de forma a minimizar a presença de interferentes na matriz.

Vários métodos de determinação das sulfonamidas em alimentos estão disponíveis na literatura internacional. Dentre os trabalhos sobre resíduos de sulfonamidas em mel por HPLC pode-se destacar: ZOTOU e VASILIADOU [11]; MAUDENS, ZHANG e LAMBERT [61]; MARTEL e ZEGGANE [62]; PANG *et al.* [63]; HORIE *et al.* [64]; dentre outros.

Zotou e Vasiliadou [11] desenvolveram um método seletivo para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel por SPE-RP-HPLC com detecção UV. A separação das sulfonamidas foi realizada usando coluna C18 (ODS-3), no modo isocrático, e como fase móvel utilizou-se metanol e solução-tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com 1% de ácido acético

(v/v). A detecção UV foi em 263 nm. As amostras de mel foram diluídas em solução-tampão acetato (0,05M) pH 3,6. Utilizou-se cafeína como padrão interno. A extração do resíduo foi realizada usando extração em fase sólida com cartuchos de fase polimérica (Nexus). Recuperações médias dos analitos variaram de 80 a 117%, com limites de detecção de 20 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Maudens, Zhang e Lambert [61] desenvolveram e validaram um método para determinação de doze sulfonamidas (sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina e sulfadoxina) em mel. O pré-tratamento da amostra incluiu uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} , seguida por extração líquido-líquido e extração em fase sólida (utilizando cartucho de troca catiônica). A separação foi realizada utilizando-se coluna RP18, no modo gradiente, e com fase móvel constituída de acetonitrila e solução-tampão acetato (0,020 mol L^{-1}) pH 4,75. A detecção foi realizada em comprimento de excitação de 420 nm e comprimento de emissão de 485 nm. O método demonstrou boa exatidão e precisão. O pré-tratamento da amostra aumentou a eficiência do *clean up*. Foram encontradas recuperações médias, nos três níveis, variando de 38,2 a 66,8% e limites de detecção e quantificação de 1 ou 2 e 2 ou 5 ng g^{-1} , respectivamente.

Martel e Zeggane [62] descreveram um método para determinação de sulfatiazol em mel. Foi realizada uma etapa de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. Uma alíquota da amostra hidrolisada utilizando ácido clorídrico 1 mol L^{-1} e submetido a uma pré-coluna de derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com detector por fluorescência, usando coluna C18 (Hypersil BDS), no modo isocrático, e com fase móvel composta de acetonitrila e solução de ácido acético 2%. Para a detecção por fluorescência foi aplicado um comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. O limite de quantificação foi de 10 ng g^{-1} . As recuperações variaram de 60,6 a 71,8%. A estimativa do desvio padrão relativo variou na faixa de 0,5 a 2,9%.

Pang *et al.* [63] desenvolveram um método para a determinação de oito sulfonamidas (sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido fosfórico (pH 2). As amostras foram filtradas e em seguida procedeu-se à extração em fase sólida utilizando-se dois cartuchos um de troca catiônica e outro OASIS HLB. Procedeu-se à derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada por cromatografia líquida por detecção por fluorescência, usando coluna RP 18, no modo

isocrático, e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e solução de dihidrogeno-fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹. A detecção foi realizada com comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. Recuperações médias nos três níveis de fortificação variaram de 73,5 a 94,1% e coeficientes de variação de 4,35 a 16,60%. O limite de detecção foi de 0,002 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina, e 0,005 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina. O limite de quantificação foi de 0,005 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina e 0,010 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

Horie, Satto e Nose [64] desenvolveram um método usando cromatografia líquida por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) para a determinação simultânea de dez sulfonamidas (sulfatiazol, sulfacloropiridazina e sulfaquinoxalina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 30% e, então, extraídas com diclorometano. Os extratos foram percolados em cartucho de Florisil para realizar um *clean up* na amostra. A separação cromatográfica foi realizada em coluna RP-18 (Lichosphere), como fase móvel utilizou-se solução de dihidrogeno fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹) e acetonitrila. A detecção foi a 275 nm. As recuperações no nível de 0,05 µg g⁻¹ foram de 62,1 a 90,2% e os limites de detecção foram 0,05 µg g⁻¹ para cada composto.

Na Tabela 3 são apresentados métodos cromatográficos assim como os métodos de extração reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em mel e em outras matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
HAMMEL <i>et al.</i> [22]	Mel	SDZ,SMR,STZ,SPD, SAD,SMZ,TAP,SME, DAP,SID,SMTX,SDM, STR,DHS,CAP,SBM, OTC,AMP,TC,SDX, SQX,DMC,CTC,NEO, PENG,SPI,DC,PEN, DES,OLE,TIL,TYL, OXA,EA,CLOX,NAF, DIC,ROXI,AMOX,SCP	HPLC-ESI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 26-61% e Limites de detecção de 31,3-49,0 µg/kg
WANG <i>et al.</i> [65]	Mel e frango	SMT, SMR e SDZ	HPLC-DAD Imunoensaio com polarização fluorescente	Foram encontradas recuperações de 86-131%. Limites de detecção de 0.9 ng g ⁻¹ 3.1 ng g ⁻¹ .
TAMOSUNAS e PADARAUSKAS [66]	Mel e ovos	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPLC-MS/MS UPLC-MS/MS LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 80-110%. Limites de decisão de 6.61-9.43 µg kg ⁻¹ and 7.25-11.9 µg kg ⁻¹ para UPLC e LC, respectivamente.
GRANJA <i>et al.</i> , [67]	Mel	STZ, SMZ E SDM	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 61.0% a 94.5%. Limites de detecção de 3 µg kg ⁻¹ , 4 µg kg ⁻¹ and 5 µg kg ⁻¹ respectivamente
ZOU <i>et al.</i> , [68]	Mel	STZ, SPD, SDZ, SMR, SMMX, SCP, SMX, SDM	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações > 70%. Limites de detecção 4 µg kg ⁻¹ .
MOHAMED <i>et al.</i> [24]	Mel	SAD,DAP,SPD,SDZ, SMTX,STZ,SMR,SMX, SMP,SME,SCP,SQX, SDX,SDT,SSZ	HPLC-APPI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,4% e Limites de quantificação de 10 µg/Kg
KOESUKWIWAT <i>et al.</i> [23]	Leite	SDZ,STZ,SMZ,SMP, SMX,SDM,CTC,TC OTC,PYR	HPLC-ESI-MS SPE	Foram encontradas recuperações de 5-166% (nos vários níveis)
SUN <i>et al.</i> [9]	Envoltório para salsicha (tripa de origem animal)	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMDZ,SMT,SMMX, SMP,SIA,SMX,SDM, SQX	HPHPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 65,2-85,9%. Limites de detecção de 0,3-0,4µg/kg e limites de quantificação de 1,5-2,2 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
LU <i>et al.</i> [25]	Carne (suína)	SDZ,STZ,SMR,SMT, SMMX,SMXZ,SQX, SDMX	HPLC-ESI-MS HPLC-APCI-MS SPME	Limites de detecção de 16-39 µg/Kg e limite de quantificação de 53-130 µg/Kg
KISHIDA [26]	Carne (bovina, aves, suína)	SDD,SDZ,SMM,SMX, SDM,SQX	HPLC-MS MSPD	Foram encontradas recuperações de 90,5-97,6% e Limites de quantificação de 0,006-0,04 µg/g
GARCÍA <i>et al.</i> [17]	Visceras de animais (rim)	SDZ,SMT,SMP,SMX SDM,SQX	HPLC-DAD LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 46-63%. Limites de decisão de 3,48-3,84 µg/Kg e Capacidade de detecção de 109,8-161,7 µg/Kg
BISWAS <i>et al.</i> [69]	Carne (búfalo)	TMP,SDD,SDX,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 75-108%. Limite de detecção de 0,031µg/g e limite de quantificação de 0,062 µg/g
FELTRIN <i>et al.</i> [10]	Leite	SDX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 76-90% e limite de detecção de 4,59µg/L e limite de quantificação de 13,9 µg/L
ZOTOU e VASILADOU. [11]	Mel	SCT,STZ,SPD,SMR SMP,SMX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 80-117% e Limites de detecção de 20-25µg/Kg
WANG <i>et al.</i> [49]	Produtos de origem animal	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPHPLC,HPCE, THPLC,ELISA, IMUNOENSAIOS LLE,SPME,SPE	Vários artigos sobre sulfonamidas em alimentos de origem animal
GALLINA <i>et al.</i> [12]	Mel	Streptomycina, Tylosin, SAD,SDZ,STZ,SMZ, SDX,SMTX,SDM	HPLC-FL LLE	Foram encontradas recuperações de 11,5-96,5%. Limites de detecção de 1,7-22ng/mL e limites de quantificação de 5,5-75 ng/mL
PECORELLI <i>et al.</i> [70]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SMMX,SCP,SMX SQX,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 62,4-85,1% e Limite de decisão 105,3-109,5 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
KISHIDA e FURUSAWA [19]	Carne (aves) e ovos	SMM,SDM,HIDRÓXI/N ⁴ -ACETIL	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 90-97% e limites de detecção de 7,2-29,8 ng/mL
LAMBA <i>et al.</i> [71]	Leite	SAD,SGN,SDZ,STZ, SMTX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 85-114%. Limites de detecção de 1,59-7,68 nmol/L e limites de quantificação de 5,3-25,59 nmol/L
PANG <i>et al.</i> , [72]	Mel	STZ, SCT, SAI, SMM, SDX,SDZ, SPD, SCP, SMTX, SMR, SMP, SDM, SMZ, SME	HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70.9-102.5%. Limites de quantificação de 1.0 and 12.0 µg/kg
POSYNIK <i>et al.</i> [73]	Carne (frango)	SDZ,SMZ,SMX,SMR, SDM,SMP	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações de 90-95%. Limites de detecção 1 ou 5 µg/Kg CCα: 103,8-127,6 µg/Kg CCβ: 115,0-137,4 µg/Kg
MAUDENS <i>et al.</i> [61]	Mel	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SME, SMT,SMP,SCP,SDX	HPLC-FL LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 37,4-66,8%. Limites de detecção de 1-2 ng/g e limites de quantificação de 2-5ng/g
PECORELLI <i>et al.</i> [18]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SQX,SDM,SCP, SMM,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 51-109% CCα: 105,2-116,2 µg/Kg CCβ: 110,9-134,9 µg/Kg
GENTILI <i>et al.</i> [60]	Carne e alimentos infantis	SID,SDZ,SPD,SMR, SMO,SMZ,SMT,SMP, SMM,SCP,SMX,SQX, SDM	HPLC-MS/MS	Foram encontradas recuperações de 70-101%. Limite de detecção de 2,6 ppb e limites de quantificação de 1,2-7,8 ppb
ZAYAS-BLANCO <i>et al.</i> [13]	Leite	SMZ	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 82,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 3µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
POSYNIAK <i>et al.</i> [74]	Mel	SCT,STZ,SMZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80%. Limites de detecção de 0,1µg/Kg e limites de quantificação de 0,2 µg/Kg
PANG <i>et al.</i> [63]	Mel	SCT,SPD,SMR,SMP, SME,SCP,SMX,SDM	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 73,5-94,1%. Limites de detecção de 0,005mg/Kg e limites de quantificação de 0,002 mg/Kg
REYBROECK [75]	Mel	Streptomycin, Tetracyclines, Cloranfenicols, SMZ, STZ,SCT	HPLC-UV	Limites de detecção para as sulfas de 25-50µg/Kg e limite de quantificação para as sulfas de 20µg/Kg
MARTEL e ZEGGANE [62]	Mel	STZ, SMZ	HPLC-FL IMUNOENSAIO DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 2µg/Kg
FURUSAWA [21]	Leite	OTC,SDD	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 88,8-93,1%. Limites de quantificação 0,044 µg/mL (OTC) e 0,023 µg/mL(SDD)
POSYNIAK <i>et al.</i> [76]	Mel	SCT,SMT,STZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80,9-83,4%. Limite de detecção de 0,1-0,5µg/Kg
HELLER <i>et al.</i> [77]	Ovos	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SMZ, SMT,S P,SCP,SMX, SMMX,SIA,SDM,SQX	HPLC-MS-MS HPLC-UV LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 51-103%
FURUSAWA [14]	Leite	SMZ,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 81-94%. Limites de detecção de 5-10ng/mL e limites de quantificação de 3-5ng/mL

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
STOEV e MICHAILOVA [78]	Produtos de origem animal	SAD,SDZ,SMR,SDD, SMP,SOX,SMX,SDM, SQX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 64-75% e Limites de detecção de 0,5-1,0 µg/g
ITO <i>et al.</i> [79]	Visceras de animais (rins e fígado)	SDZ,SMR,SDD,SMP, SAI,SMMX,SMTX, SDM,SQX	HPLC-UV HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70,8-98,2% e Limites de detecção de 0,03 µg/g
FURUSAWA [80]	Leite	SMZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações maiores que 83% e Limites de detecção de 4 µg/kg
HEERING <i>et al.</i> [81]	Mel	TC, Streptomycin, STZ	Imunoensaio - EIA	Foram encontradas recuperações de 100-105%. Limites de detecção de 50 µg/g
GEHRING <i>et al.</i> [82]	Salmão	SDZ	HPLC-API/MS	Foram encontradas recuperações de 59,2-78,3%. Limite de detecção de 0,2 ng/g e limite de quantificação de 1,0 ng/g
CANNAVAN <i>et al.</i> [83]	Carne	SMT	CG-MS SPE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 86-114% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
VIÑAS <i>et al.</i> [84]	Leite	SA,SGN,SDZ,SPD,SMX	HPLC-FL LLE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 82-104% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
HORIE <i>et al.</i> [64]	Mel	STZ,SDZ,SMR,SMP, SDD,SMMX,SCP, SMX,SQX,SDM	HPLC-DAD SEM EXTRAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 62,1-90,2%. Limites de detecção de 0,8µg/g
AGARWAL [15]	Leite	SDZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 83-88%
PATHY [85]	Carne	SQX	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 77-85%

3.1 PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise de quantidades muito pequenas (traços) de contaminantes em matrizes complexas como alimentos frequentemente requerem inúmeras etapas de preparação e extração de amostras antes das técnicas de análises instrumentais (detecção e quantificação). Dentre as várias etapas envolvidas na preparação de amostras, alguns passos são mais comuns, tais como amostragem (homogeneização), extração, *clean-up* (eliminação de interferentes), separação e concentração, detecção e quantificação dos analitos [86].

Técnicas, como a cromatografia a líquido, requerem uma etapa de preparo da amostra antes da análise, de forma a minimizar erros na análise e evitar danos nas colunas cromatográficas [87].

Atualmente existem vários métodos para o preparo de amostras, com inúmeras possibilidades, vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método quando se trabalha com matrizes complexas, como alimentos, exigem que o analista tenha o conhecimento tanto da matriz com a qual se está trabalhando assim como da técnica instrumental que será utilizada posteriormente para a detecção/quantificação do composto, a fim de evitar, principalmente, que interferentes possam ser co-eluídos juntamente com os analitos de interesse e efeitos de matriz sejam incluídos nos resultados [88].

Segundo Queiroz, Collins e Jardim [89], as técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo do analista gasto durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras em determinado tempo.

Dentre as técnicas de extração mais comumente utilizadas para concentrar analitos em mel pode-se destacar a extração em fase sólida (EFS) [11; 63; 72; 73 e 74], extração líquido-líquido (LLE) seguida de EFS [61], e extração líquido-líquido [12 e 22].

3.1.1 Extração por Fase Sólida (EFS)

A extração por fase sólida é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [88]. O método de extração por fase sólida foi desenvolvido na década de 70, visando resolver algumas desvantagens da extração líquido-líquido e otimizar rotinas [90].

É uma técnica que consiste na separação líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica, através da qual a solubilidade de interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição [88; 91]. Através de forças intermoleculares, do tipo das de Van der Waals ou dipolo-dipolo, entre o analito e a superfície adsorvente da fase sólida ocorre o mecanismo de retenção e eluição dos analitos. Dependendo do grau de afinidade do analito com o solvente de eluição, este terá maior ou menor retenção [88].

A extração por fase sólida tem vários objetivos [87], sendo eles:

- (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;
- (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes;
- (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito; e
- (d) estocagem da amostra, muito usada para evitar o transporte de grandes volumes das mesmas.

Existem dois tipos de sistemas de extração por fase sólida: em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema em linha, a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. No sistema fora de linha (*off-line*), a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor [91]. Nesta pesquisa, utilizou-se o método de extração em fase sólido com sistema off-line.

Na prática, para uma extração por fase sólida são utilizados tubos de polipropileno no formato de seringa, contendo a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia), usualmente denominada cartucho de extração [88], conforme mostrado na Figura 6.

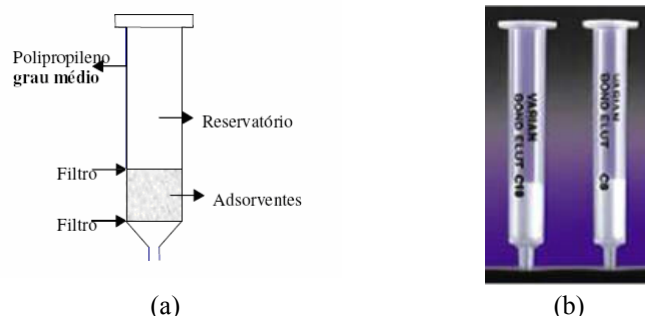


Figura 6 – (a) Esquema de cartucho para extração EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.
Fonte: (a) [88]

O atual estágio de desenvolvimento da extração em fase sólida deve-se em grande parte às descobertas de novos adsorventes [89]. No Quadro 2 são apresentados os principais tipos de adsorventes utilizados em extração em fase sólida.

Quadro 2 - Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.

Não-polares	Polares	Troca Iônica
Octadecilsilano – C18	Florisil – FL	Benzenossulfonilpropilsilano – SCX
Octilsilano – C8	Alumina – Al	Sulfonilpropilsilano – PRS
Etilsilano – C2	Sílica – Si	Carboximetilsilano – CBA
Metilsilano – C1	Cianopropilsilano – CN	Dietilaminopropilsilano – DEA
Fenilsilano – PH	Diolsilano – 2OH	Trimetilaminopropilsilano – SAX
Cicloexilsilano – CH	Aminopropilsilano – NH ₂	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA
	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA	
	Poliméricas (Nexus)	

Fonte: adaptada de [91]

Recentemente, alguns estudos visando desenvolver fases de EFS com aplicações mais específicas têm sido desenvolvidos. As fases poliméricas são exemplos típicos destas fases, as quais possuem maior capacidade de retenção que as de sílica, tendo seletividade usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel [93].

Na Figura 7 é apresentado um esquema do procedimento de extração em fase sólida. Na etapa A, ocorre a ativação e condicionamento do cartucho; na etapa B, ocorre a aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; na etapa C, ocorre a troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*) e, por último, na etapa D ocorre a troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

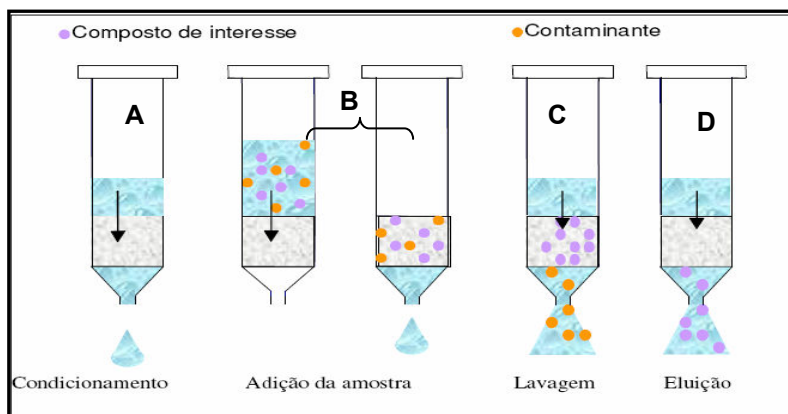
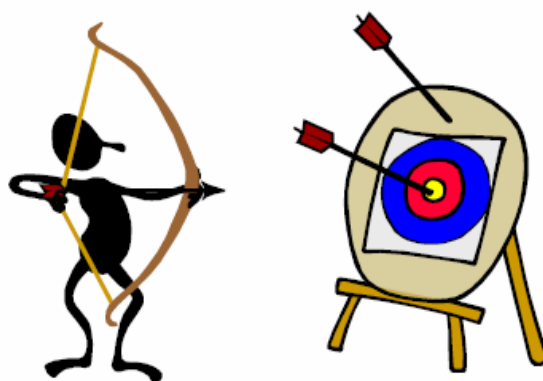


Figura 7 - Principais etapas empregadas em extração por fase sólida (EFS).

Fonte: [87]

Na prática, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com um pequeno vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Após a drenagem de toda a fase líquida, os analitos de interesse ficarão retidos na fase sólida do cartucho. O analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito pré-concentrado, ou seja, com a concentração apropriada para a análise [88].

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO



4.VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nenhuma análise química, automatizada ou manual, fornece resultados isentos de erro. Geralmente, os resultados são reportados em forma de valores numéricos que contêm informações que devem ser corretamente interpretadas e avaliadas, de acordo com as especificações do método e as necessidades de cada usuário do mesmo resultado [93]. Neste contexto, dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico, ou mesmo a adaptação de um método já existente, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [94].

Segundo o INMETRO [95], a validação de um método de ensaio é a denominação que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida. O processo de validação de métodos analíticos desenvolvidos em laboratórios é efetuado após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos. Para Barros [96] a validação do método analítico permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [97] e que envolve várias etapas. A NBR/ISO IEC 17025 [98] define que um processo de validação deve incluir a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método. Todo processo de validação deve ser abrangente o suficiente, de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos [97].

Existem vários órgãos internacionais responsáveis por processos de validação, que estabelecem muitos conceitos e procedimentos sobre este processo, gerando um grande volume de informações. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os responsáveis por processos de validação. Estes órgãos disponibilizam guias, diretrizes ou mesmo normas, para o procedimento de validação de métodos analíticos.

No Quadro 3 são apresentados os principais critérios utilizados para a validação de métodos segundo os mais reconhecidos órgãos de regulamentação, nacionais e internacionais.

Quadro 3 - Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO	ICH	USP	IUPAC
Especificidade/Seletividade	x	x	x	x	x ¹
Faixa de trabalho e Faixa linear	x	x	x	x	x
Linearidade	x	x	x	x	x ¹
Limite de Detecção	x	x	x	x	x
Limite de Quantificação	x	x	x	x	x
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	-	-	-	x
Exatidão e tendência	x ¹	x	x ¹	x ¹	x
Precisão (repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade)	x ²	x	x ¹	x ¹	x
Robustez	x	x	x	x	x
Incerteza de medição	-	x	-	-	x

¹ - Realiza calibração; ² - Não realiza tendência

Os principais parâmetros utilizados para a validação de métodos cromatográficos são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez [97]. A Figura 8 mostra um fluxograma com as etapas do procedimento analítico para a validação do método para análise de resíduos de sulfonamidas em mel proposto neste trabalho.

4.1 FAIXA DE APLICAÇÃO

A faixa de aplicação de um método refere-se ao intervalo entre a concentração superior e inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade [99].

Na prática a faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, e é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão [99].

Segundo Thompson *et al.* [100], a IUPAC estabelece duas faixas de aplicação, uma para impurezas (0-150%) e outra para macro-componentes (50-150%), sendo que o valor esperado deve estar contido dentro de uma destas duas faixas. A AOAC [101] recomenda que, para análise de traços, a faixa seja compreendida entre o limite de quantificação e duas ou três vezes o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Na análise de fármacos, a ANVISA indica uma faixa de aplicação entre 80-120% da concentração teórica do analito, e recomenda que seja determinado intervalo linear de, no mínimo, 5 níveis de concentração diferentes [102].

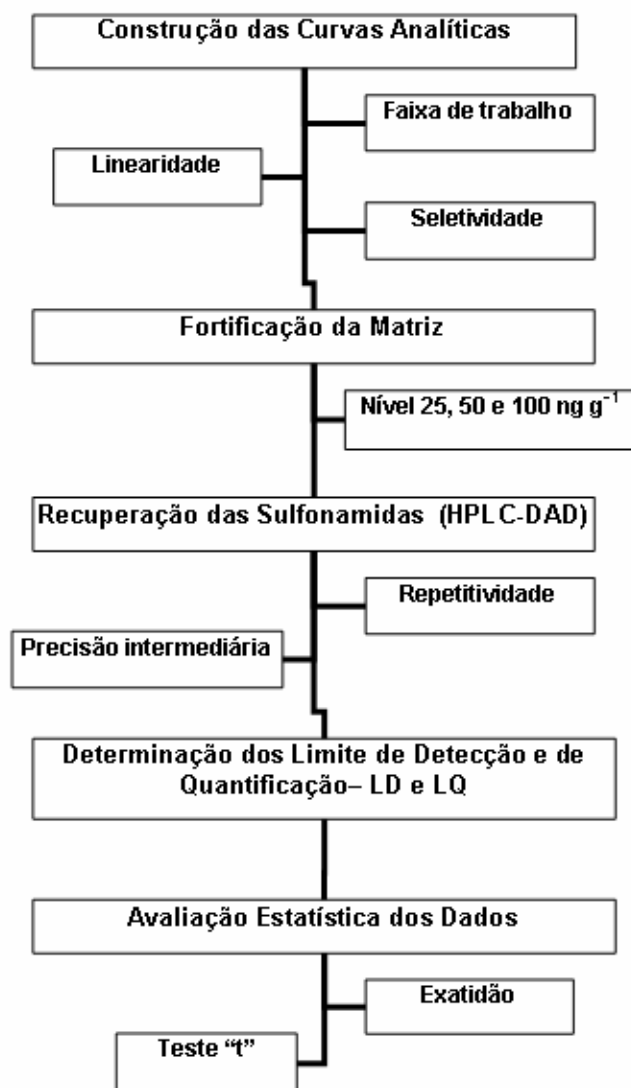


Figura 8 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação [97].

A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico [103]. Na maior parte das vezes uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito deve ser determinada empiricamente e pode ser representada como uma equação de reta, geralmente chamada de curva analítica ou gráfica de calibração, que representa a resposta de um método analítico como função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido [104].

Segundo Hubert *et al.* [105] uma outra forma de se avaliar a linearidade é por meio da relação entre concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear.

Em geral recomenda-se que o coeficiente de correlação seja maior que 0,990, sendo considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a regressão [95]. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [97].

4.3 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método analítico determinar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz [103]. A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da matriz, tais como, impurezas, ingredientes ativos, excipientes, e outros compostos de formas similares que possam estar presentes [106].

A seletividade é um parâmetro muito importante quando se trabalha com análises de multiresíduos. Deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, não sendo um parâmetro a ser realizado uma única vez, e sua realização deve ocorrer de forma contínua. Conhecer os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a análise ajuda na escolha das melhores condições para detecção. É através da seletividade que se garante que o pico cromatográfico seja o do composto em estudo [97].

4.4 PRECISÃO

A precisão refere-se à proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas [99]. Pode ser expressa pelo desvio dos resultados em relação à sua média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV) [97], conforme apresentado na equação 1.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{X}$ = média das recuperações.

Em análises de traços são aceitos valores de RSD de até 20%, já para métodos que quantificam compostos em macro-quantidades, o RSD deve ser de 1 a 2%. A precisão também pode ser melhorada através de um maior número de replicatas [107].

Comumente, a precisão de um método analítico em validação de métodos pode ser expressa como repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade [100].

4.4.1 Repetitividade

A repetitividade (ou repetibilidade) refere-se à precisão entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições, equipamentos, analistas, em um curto intervalo de tempo [99]. O INMETRO [95] recomenda sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r').

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo a mais aconselhável de ser adotada. Tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente os resultados não tenham diferença [99; 97]. O número de ensaios para a precisão intermediária segue a mesma recomendação que para a repetitividade segundo INMETRO [95].

4.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, ou seja, em localidades diferentes, utilizando um mesmo conjunto de amostras [103]. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratoriais), e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em legislações, ou farmacopéias etc... [97].

4.5 EXATIDÃO

A exatidão é estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [103]. Sempre se considera a exatidão dentro de certos limites, a um dado nível de confiança [97]. Para a ANVISA [58] e o ICH [99] é necessário um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração.

Os procedimentos mais recomendados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do analito. Para a análise de matrizes biológicas, como alimentos, os ensaios de recuperação são os mais utilizados [97; 103].

4.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação pode ser definido como a quantidade de analito presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada [100]. A recuperação está relacionada com a exatidão, porque reflete a quantidade de determinada substância recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra [103].

Na prática, o estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, também sendo denominada de fortificação. A equação 2 apresenta a relação utilizada para os cálculos da percentagem de recuperação.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

Na Figura 9 é mostrado o esquema proposto por Brito [108] para representar o processo de fortificação.

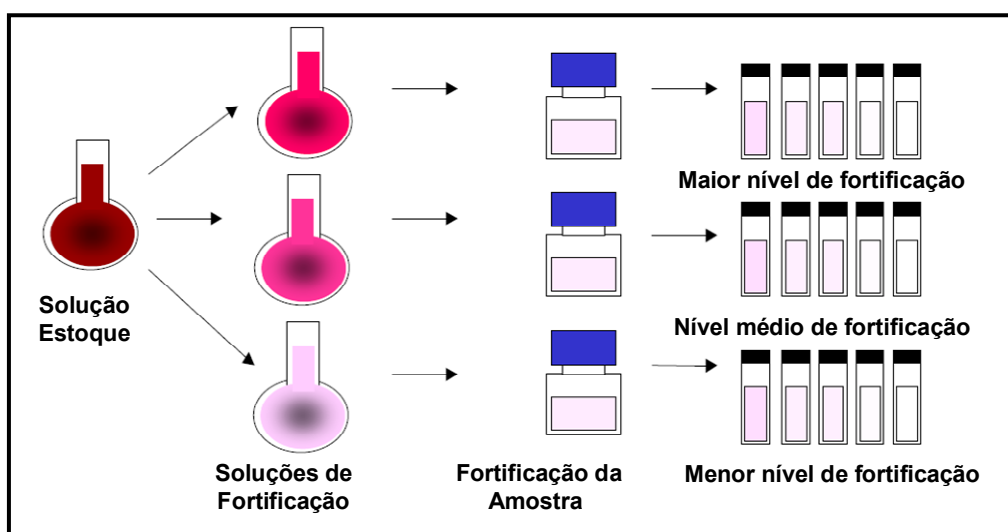


Figura 9 - Processo de fortificação das amostras.
Fonte: [108]

A limitação do procedimento de recuperação baseia-se no fato de que a substância adicionada não se apresenta na mesma forma que a encontrada originalmente na amostra, devendo-se ter o cuidado de reproduzir ao máximo as condições originais da amostra. Outro fator limitante para os ensaios de recuperação é o efeito da matriz, uma vez que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, sendo necessário investigar e eliminar estes efeitos dos interferentes [104].

Para garantir que os resultados sejam confiáveis é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, devendo-se avaliá-la na faixa de concentração esperada do composto de interesse [97].

Segundo a Comunidade Européia [109] os intervalos aceitáveis para recuperação em análises de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Contudo, em função da complexidade da composição da amostra esta faixa de variação pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 35\%$.

No estudo de recuperação também são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de *Student* de acordo com a equação 3. Se o valor “t” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato.

$$t_{calc} = \frac{(Rec - 100)}{s_{rec} / \sqrt{(n-1)}} \quad (3)$$

Onde: Rec é a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 é a recuperação percentual desejada; n é o número de determinações (em geral, um mínimo de 5 repetições); s_{rec} é o desvio padrão nas recuperações.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual para a determinação do limite de detecção, pelo método da relação sinal/ruído e por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica [97].

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração detectável em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas; S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*).

4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas [97]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [103].

A determinação do valor do limite de quantificação do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a validação dos resultados, tornando o método menos preciso [110]. Concentrações maiores para o limite de quantificação deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão [96].

O limite de quantificação também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o limite de detecção, sendo que para o limite de quantificação a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e, a equação utilizada é demonstrada na equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

5. MATERIAIS E MÉTODO



5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do método para a determinação de sulfonamidas em amostras de mel cinco etapas foram planejadas. A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a revisão bibliográfica sobre a ocorrência de sulfonamidas em alimentos e mel de forma a reunir dados científicos e literatura para oferecer suporte no desenvolvimento do método. A segunda etapa consistiu no estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas para a análise quantitativa. Uma vez otimizados os parâmetros cromatográficos estes foram fixados e em seguida foram obtidas curvas analíticas dos compostos. Na terceira etapa foi feito um estudo de pré-tratamento da amostra utilizando hidrólise ácida e também foram estabelecidas e otimizadas as condições de extração em fase sólida. As amostras usadas nesta etapa foram às coletadas na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA. Na quarta etapa procedeu-se à validação do método proposto. A última etapa foi realizada pela aplicação do método, utilizando-se amostras de méis comerciais coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins.

5.1.1 Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas

As amostras de mel foram coletadas no apiário Turimel, localizado na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA que está localizada na região do Alto Turu, no estado do Maranhão, às margens da BR 316. A área total do município é de 904, 95 km², localizando-se próximo à fronteira do Estado do Pará, a 420 quilômetros da capital do Maranhão, São Luís.

Segundo apicultores do local a flora comumente visitada pelas abelhas da região inclui as seguintes plantas (nomes populares): chanana, assa-peixe, vassourinha de botão, hortelãzinho, bamburral, juçara, embaúba, maria-mole, cajueiro, laranjeira e seringueira.



Figura 10 – Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.

Fonte: adaptado de [111]

A coleta das amostras para o desenvolvimento do método foi realizada no mês de setembro de 2007. O critério estabelecido para a coleta das amostras a serem utilizadas para o desenvolvimento do método foi a ausência de resíduos de fármacos e outros resíduos de contaminantes. Optou-se por fazer a coleta neste apiário após análise do histórico produtivo do apiário, onde se evidenciou a preocupação com a qualidade do produto. O apiário, atualmente, está buscando certificação orgânica, fato este que serve como indício de que o mel produzido neste apiário seja livre de resíduos de contaminantes.

Foram coletados 30 kg de mel e estes foram armazenadas em frascos de vidro envoltos por papel alumínio a fim de evitar degradação de alguns compostos por ação da luz. Outro cuidado tomado com as amostras foi manter uma vedação dos frascos eficiente, visando impedir a entrada de ar e início de possíveis processos fermentativos. As amostras foram conservadas a temperatura ambiente.

Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para o início das atividades de pesquisa.



Figura 11 - (a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.

5.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram:

5.2.1 Padrões

- Sulfadiazina (SDZ) – Sigma Aldrich, com pureza de $\geq 99\%$;
- Sulfadimetoxina (SDM) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfadimidina (SDD) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% ;
- Sulfatiazol (STZ) – Sigma Aldrich, com pureza de 99% .

5.2.2 Reagentes e Solventes

- Metanol (HPLC solvent Merck-Germany);
- Acetonitrila (HPLC solvent Merck-Germany);
- Água ultra pura (Milli-Q), sistema Millipore;
- Acetato de Sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) M.M. 136,09 - Merck-Germany ;
- Ácido Acético Glacial P.A. (CH_3COOH)- M.M 60,05 - Merck-Germany.

5.2.3 Dispositivos para Extração por Fase Sólida

- Octadecil silano (C_{18}): cartucho - C_{18} – 500 mg/6mL – AccuBON^{II}ODS – Agilent Technologies;

- Octil silano (C₈): cartucho - Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- Cartucho: ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian.

5.2.4 Coluna Cromatográfica

- Coluna cromatográfica analítica - Phenomenex – 150mm x 4,0 µm d.i, recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica.
- Coluna de Guarda para coluna C-18 – Phenomenex, KJ0-4282.
- Coluna cromatográfica analítica C₈ - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb-Varian.

5.2.5 Equipamentos

- Balança eletrônica, modelo Bel Mark 210A, faixa de pesagem de 10mg-210g – Bell Engineering, Italy;
- Banho ultra-som USC 1450 – Unique Thorton, Brasil;
- Bomba de vácuo – Marconi, modelo MA058, Brasil;
- Cromatógrafo a Líquido marca Varian (EUA), composto por:
 - Bombas de alta pressão - binária - Varian Polaris ProStar 210/210;
 - Injetor manual, loop 20µL - Rheodyne;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, Varian Polaris ProStar 335 – Varian (EUA);
 - Computador Digital, Intel Core 2, 2,4 GHz, HD 160 Gb, com impressora HP Deskjet D 4160;
- Deionizador de água – Milli-Q Academic System – A10, sistema Millipore (EUA);
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian (EUA);
- Rotaevaporador – Fisatom – Brasil, modelo 802;
- pHmetro Hanna Instruments, com eletrodo de pH HI 1110B (vidro combinado) modelo pH 21, Brasil;

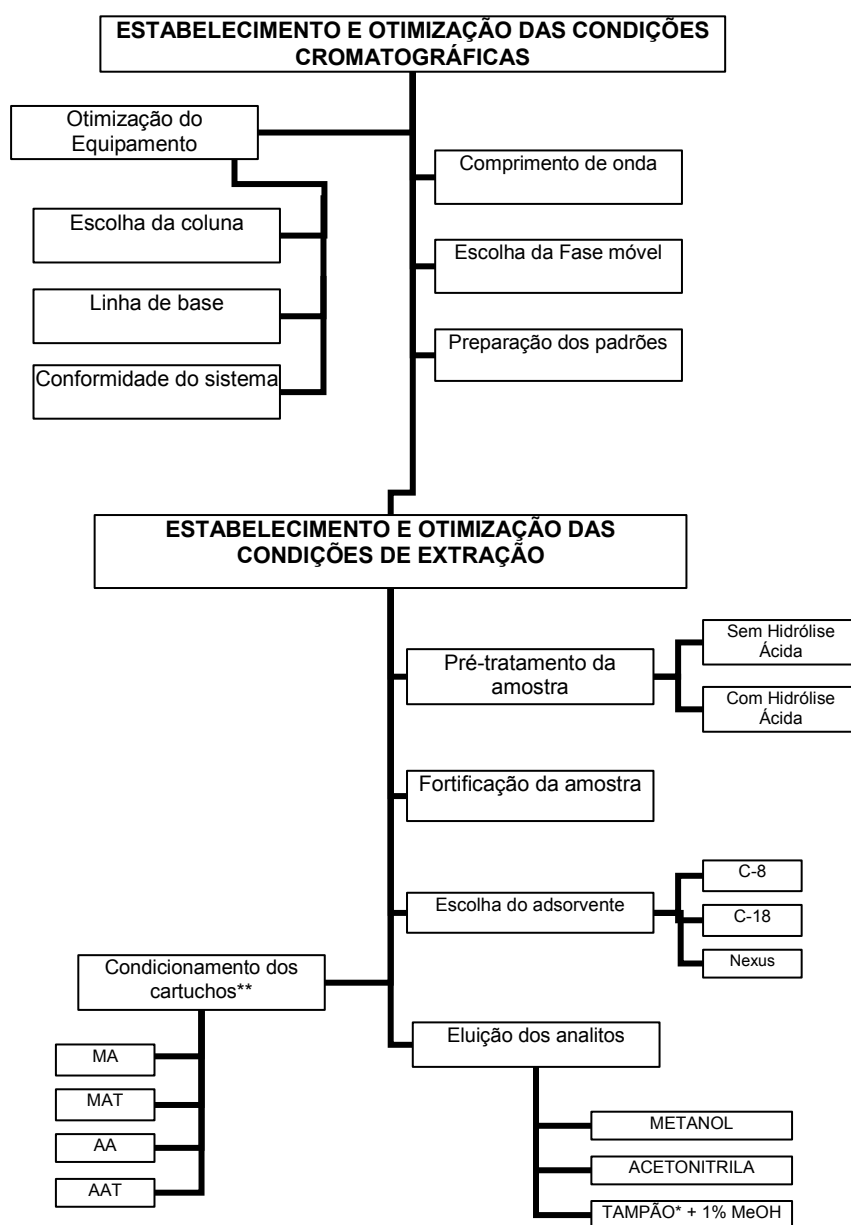
5.2.6 Outros materiais

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0 e 1000,0 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 10 e 100 mL;
- Espátula de aço inox;
- Membrana Acetato de celulose, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - SartoriusMerck;
- Membrana de Vidro, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - Merck
- Detergente Extran – Merck;
- Outros materiais de laboratório (Becker, proveta, micro pipetadores (100-1000 µL e 10-100 µL), funil de separação, pipeta, pipeta de *Pasteur*);
- Sistema de extração a vácuo (*manifold*), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (EUA).
- Gás nitrogênio (N₂) – *White Martins* (Brasil);

5.3 MÉTODO

Os métodos de análises de resíduos de sulfonamidas são desenvolvidos para atender as análises de analitos individuais e análise simultânea de vários resíduos, denominadas “análise multiresíduo”. O desenvolvimento de métodos multiresiduais, em geral, são muito trabalhosos, uma vez que são determinados analitos com características diferentes sofrendo também interferência dos constituintes da matriz que normalmente interferem na análise.

A Figura 12 mostra um fluxograma com a visão geral das etapas do procedimento analítico para o estabelecimento das condições cromatográficas e condições para as extrações.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

** MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.

Figura 12 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.

5.3.1 Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas

A primeira etapa para o estabelecimento das condições cromatográficas consistiu na otimização do equipamento, onde foram realizados os experimentos para escolha da coluna, linha de base e conformidade do sistema (de acordo com os critérios citados por SHABIR,

[113]). O estudo das condições cromatográficas compreendeu seleção do comprimento de onda, escolha da composição da fase móvel e solvente para preparação das soluções-padrão.

5.3.1.1 Seleção da coluna

Para a análise das sulfonamidas foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octilsilano C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb -Varian) e a outra contendo uma fase estacionária octadecilsilano C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm - Phenomenex).

5.3.1.2 Linha de Base do Solvente

É o sinal obtido pelo sistema cromatográfico detector DAD, mais a coluna utilizada com a injeção do solvente. O sinal da linha de base foi obtido injetando-se 20 µL de metanol, um dos solventes a ser utilizado nos procedimentos de desenvolvimento e validação do método. Este teste também forneceu informações sobre o grau de pureza do mesmo, que deve ser grau resíduo (CLAE), necessário para análise de traços de fármacos, com um mínimo de impurezas possível.

5.3.1.3 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada na etapa de otimização do equipamento, assim como no desenvolvimento e validação do método. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção (k'), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critérios de aceitação foram utilizados os parâmetros recomendados por Shabir [113], conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Limites
Fator de retenção (k')	$1 < k' < 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$
Número de pratos teóricos da coluna sendo usada (N)	$N/m > 8000$

Fonte: adaptado de [113].

5.3.1.4 Seleção do Comprimento de onda

Foram realizados dois testes para obtenção dos espectros de absorção, um utilizando espectrofotômetro modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) e outro usando o próprio detector do cromatógrafo (ProStar 335 - Varian). Os espectros de absorção obtidos no espectrofotômetro corresponderam a uma varredura de 190 a 300 nm e a varredura feita no detector do cromatógrafo correspondeu a 250 a 280 nm. O comprimento de onda correspondente à absorbância média dos analitos foi posteriormente utilizado para a determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos.

5.3.1.5 Seleção da fase móvel

Para a análise cromatográfica (CLAE) dos analitos foram testados seis tipos de fases móveis, no modo gradiente.

O preparo dos solventes para a fase móvel consistiu na filtração em kit para filtração com membrana de porosidade 0,45 µm para solventes, orgânicos e água, e desgaseificação em banho ultra-som por 20 minutos para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em garrafas próprias para solventes e foram rotuladas com informações a respeito da sua composição e o valor do pH. Antes do início dos trabalhos as soluções permaneceram no banho ultra-som por 10 minutos para a retirada de gases dissolvidos.

5.3.1.6 Preparação dos padrões

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas, individualmente, pela dissolução dos padrões em metanol. Pesou-se em balança analítica 0,0010g da sulfonamida e solubilizou-se cada uma em metanol, completando-se o balão para 0,01 L de solução. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar rotulado e com tampa de rosca para ser estocado. As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4°C, para evitar degradação dos padrões.

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o teste a ser realizado. Foram utilizados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho: solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 4,5 e solução aquosa de ácido acético 0,1%. As soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações e usadas para fortificação das amostras e para preparo das soluções padrão em extrato para os testes de recuperação e linearidade.

Os padrões foram injetados individualmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após conhecido o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos (solução contendo uma mistura dos quatro padrões – solução mix, a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

5.3.2 Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração

Os métodos de análises cromatográficas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. A etapa de extração em geral é o ponto crítico da análise, por ser responsável por erros nos resultados. As etapas de estabelecimento e otimização das condições de extração consistiram no pré-tratamento da amostra (hidrólise ácida), escolha do adsorvente (C8, C18 e Nexus), condicionamento dos cartuchos (metanol:água; metanol:água:tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5); acetonitrila:água; acetonitrila:água: tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5) e escolha do solvente para eluição (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 com adição de 1% de metanol).

5.3.2.1 Pré-tratamento da amostra

O mel é uma amostra complexa composta por várias substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes. Para diminuir o efeito da matriz na análise cromatográfica alguns trabalhos na literatura sugerem uma etapa de hidrólise ácida antes da extração a fim de romper possíveis ligações de interferentes com os analitos de interesse.

No presente trabalho, foram realizados vários testes para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. A massa de mel foi fixada em 1,0 g, de forma a diminuir o número de variáveis a serem testadas. Os parâmetros estudados

foram: concentração do ácido, volume de ácido a adicionar, tempo de hidrólise e forma de agitação. Na Tabela 5 são apresentados os testes realizados.

Tabela 5 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

A etapa de hidrólise ácida propriamente dita consistiu na adição de um volume de ácido em 1,0 g de mel. A solução de mel (extrato) foi levada para agitação por um determinado tempo. Após a hidrólise ácida os extratos hidrolisados de mel tiveram seu pH ajustado para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e solução tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5. Os extratos de mel após ajuste do pH foram filtrados em membrana de filtração (membrana de acetato de celulose) para retirada de quaisquer partículas que possam estar presentes no extrato.

5.3.2.2 Seleção do adsorvente

Visando obter uma melhor recuperação do analito, três adsorventes foram avaliados, sendo eles:

- EFS Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- EFS ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian;
- EFS C₁₈ – 500 mg/6mL – AccuBOND^{II}ODS – Agilent Technologies.

5.3.2.3 Condicionamento dos cartuchos

Os solventes testados para o condicionamento do cartucho e suas proporções foram:

metanol:água (1:1); metanol:água:tampão (1:1:1); acetonitrila:água (1:1); e acetonitrila:água:tampão (1:1:1).

5.3.2.4 Eluição dos analitos

Para verificar a melhor condição de extração das sulfonamidas foram testados três solventes para eluição, sendo eles: metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5 com adição de 1% metanol.

5.3.2.5 Extração por EFS

A fortificação das amostras para os estudos de extração consistiu na adição de volumes de solução padrão dos analitos no mel, de forma que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 µL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L⁻¹.

Os cálculos realizados foram realizados do seguinte modo: para se obter a concentração de 0,10 mg L⁻¹ das quatro sulfonamidas em 1000 µL de solução final, por exemplo, necessita-se de $10 \times 10^{-3} \text{ mg}$ $\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1} \right)$.

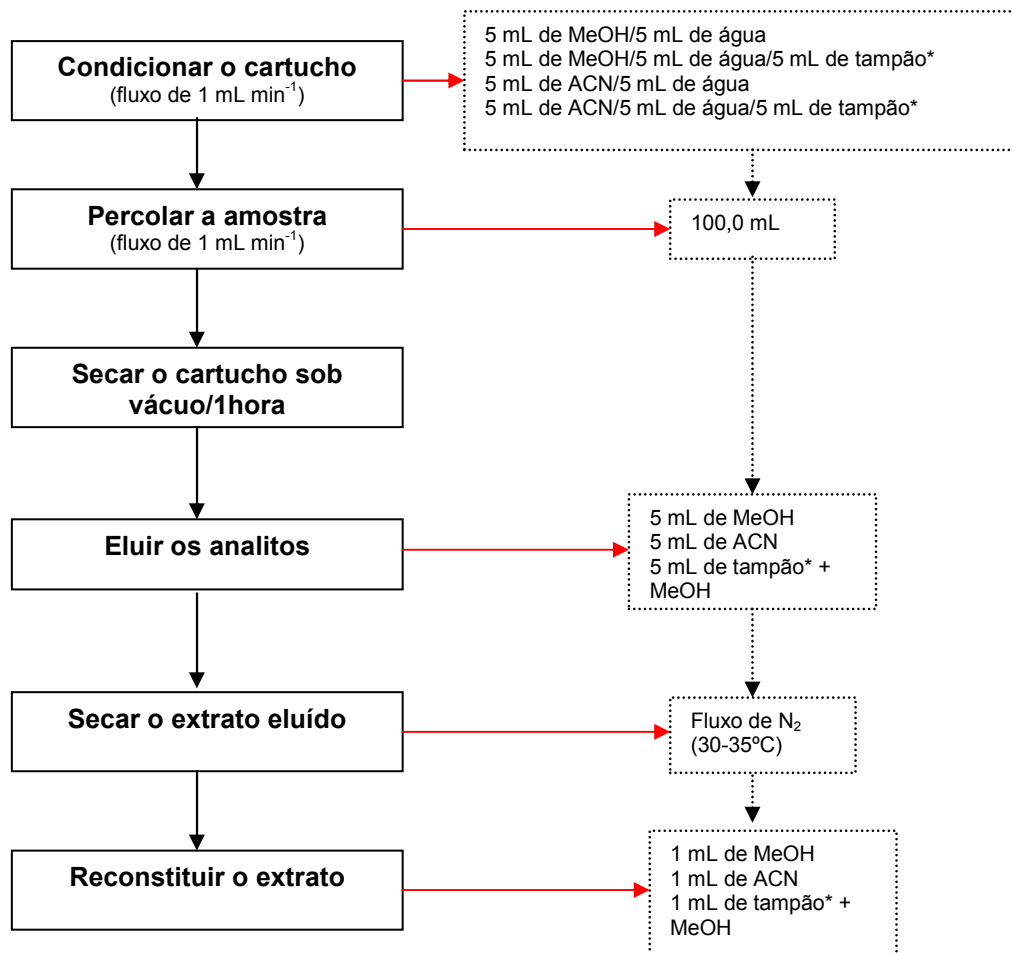
Como foi percolado um volume de 100,0 mL de extrato de mel hidrolisado enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 0,10 mg L⁻¹

$\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow C = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ mg}}{100 \times 10^{-3} \text{ L}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \right)$. Partindo-se de uma solução estoque de 1,0 mg L⁻¹,

o volume da solução padrão mista a ser adicionado no extrato de mel é de 10 mL $\left(C_{\text{padrão}} \cdot V_{\text{padrão}} = C_{\text{amostra}} \cdot V_{\text{amostra}} \rightarrow 1,0 \text{ mg L}^{-1} \times V_{\text{padrão}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 100 \text{ mL} \rightarrow V_{\text{padrão}} = 10 \text{ mL} \right)$.

Para a extração das amostras, testemunha e fortificada, foram realizadas utilizando-se sistema de extração (Manifold) sob vácuo. Antes da percolagem da amostra através do cartucho este foi condicionado com solventes, vazão de fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0 mL da amostra (fluxo de 1 mL min⁻¹), os cartuchos foram secos sob vácuo por 45 minutos. Procedeu-se a eluição dos analitos com 5 mL de solvente, em seguida os analitos eluídos foram secos sob N₂ a temperatura ambiente e posteriormente retomados com 1000 µL de solvente. Os extratos foram em seguida injetados para análise cromatográfica.

A Figura 13 mostra um esquema com as etapas do procedimento analítico para os testes de extração para determinação de sulfonamidas em mel.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

Figura 13 - Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração EFS.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA [60] e Comunidade

Européia (*EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE*) [109] para análise de resíduos em alimentos.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se testes em quintuplicata, de padrões e amostras testemunhas, com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada sulfonamida.

5.4.2 Linearidade

A região linear de resposta do detector foi determinada através de cálculo de regressão linear da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções-padrão assim como com amostras testemunhas fortificadas nas mesmas concentrações que as soluções-padrão. As soluções foram preparadas a partir de uma solução intermediária de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram injetadas cinco vezes. As concentrações utilizadas para o estudo das sulfonamidas foram: 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa linear de trabalho). Construiu-se o gráfico de calibração para os compostos estudados, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo x e os valores das áreas dos picos no eixo y.

A linearidade e a sensibilidade do método foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica. A linearidade foi expressa como o coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

5.4.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O Limite de detecção (LD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas. Para isso, foram estabelecidas as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. O Limite de quantificação (LQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas.

Determinou-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse para calcular os limites de detecção e de quantificação.

5.4.4 Estudo de recuperação

Os estudos de recuperação foram utilizados para avaliar o método quanto à precisão e exatidão; este foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 5.5).

O procedimento experimental consistiu da adição de volumes da solução padrão no mel, para que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 μL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L^{-1} .

5.4.4.1 Precisão

Foram realizados dois testes quanto à precisão do método. Verificou-se a precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de duas amostras de mel fortificadas a concentração de 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, os testes foram realizados em quintuplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Já a precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de duas amostras de mel em 3 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 25, 50 e 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

5.4.4.2 Exatidão

Os resultados e as conclusões com os dados obtidos do método analítico foram submetidos à avaliação estatística, e a expressão dos resultados foi apresentada em um determinado intervalo de confiança relacionado com os valores de exatidão e precisão dos resultados. Aplicou-se o teste “t” de *Student* nos resultados.

5.5 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras comerciais de mel, coletadas no Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (estados vizinhos ao Maranhão). Na Figura 14 é apresentado um esquema com o método proposto para a determinação de sulfonamidas em mel.

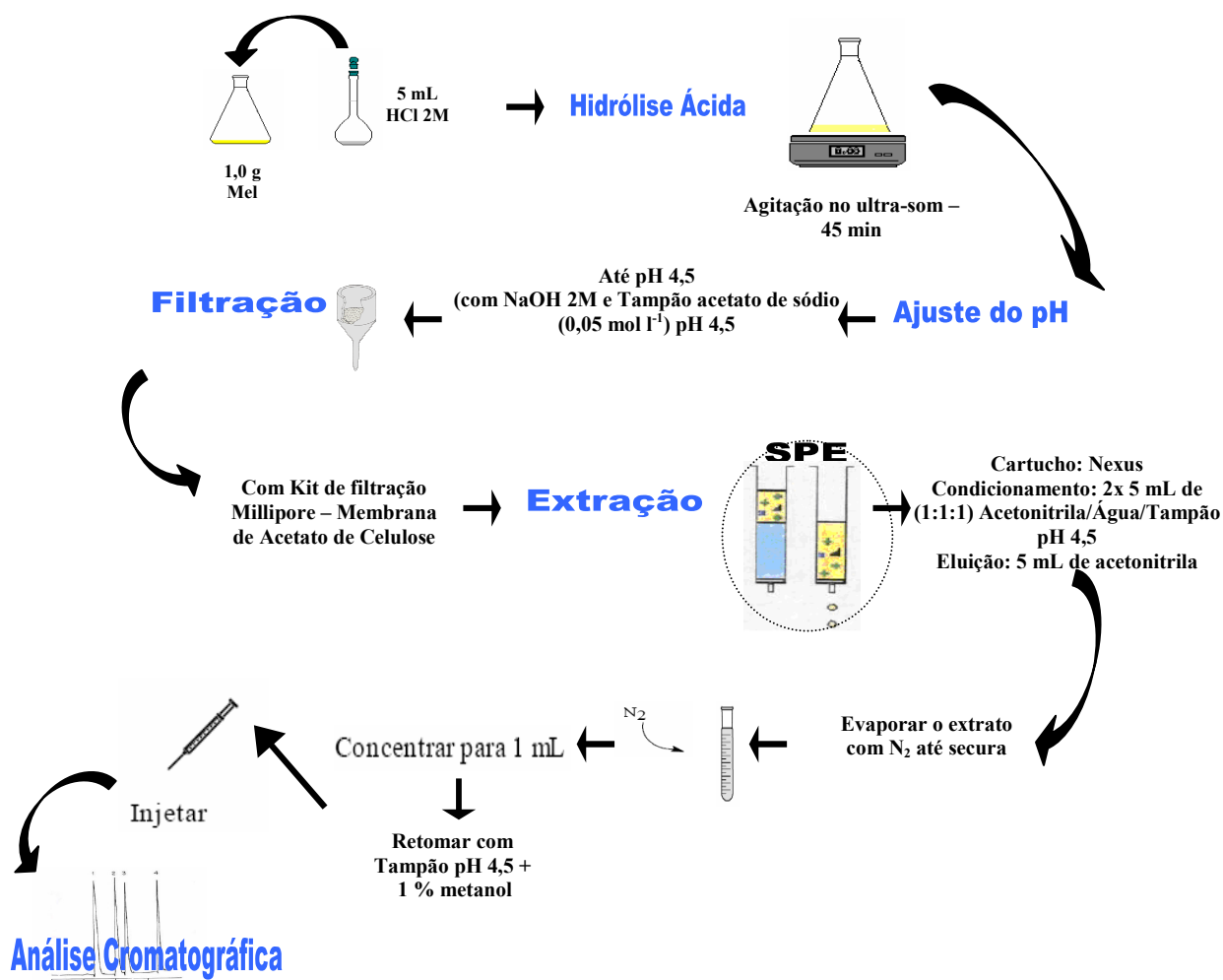


Figura 14 - Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por ZOTOU e VASILIAOUDOU [11] para a determinação de sulfonamidas em mel por HPLC-DAD que emprega solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6; como fase estacionária a coluna C18 e fase móvel: metanol e solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6, com adição de 1% de ácido acético, no modo isocrático. Os autores realizaram testes de extração em fase sólida com vários cartuchos e solventes para eluição. Para a etapa de extração foi utilizado o método recomendado por MAUDENS *et al.* [63] como referência inicial, que utilizou hidrólise ácida com ácido clorídrico 2M e extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C18.

6.1 SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Na Tabela 6 são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 300 nm para as sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram posteriormente selecionados na determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos. Os testes foram realizados com as sulfonamidas com concentração em 1 mg L⁻¹ em metanol.

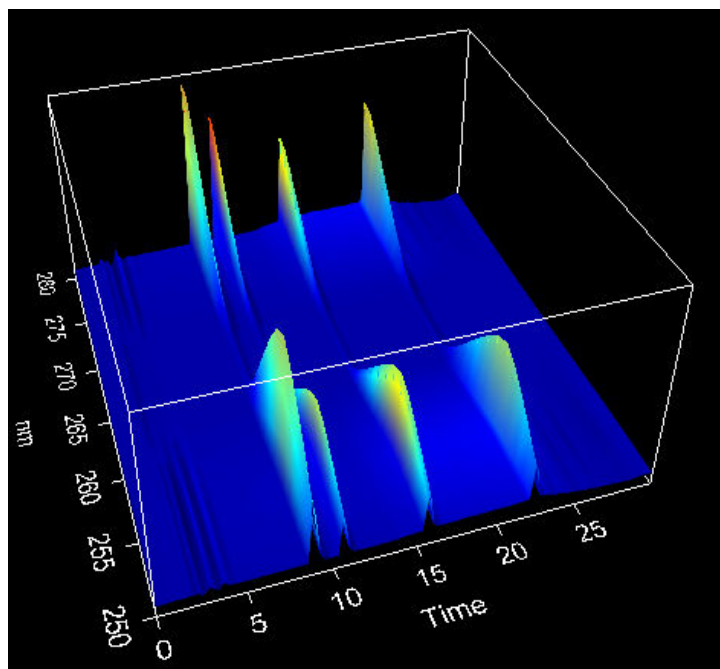
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.

Composto	λ máx (nm)
Sulfadiazina	270
Sulfadimetoxina	272
Sulfadimidina	269
Sulfatiazol	260

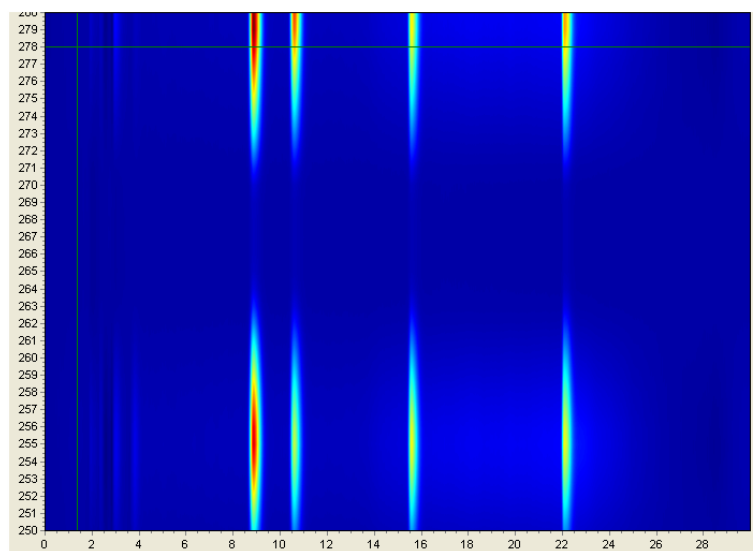
Nas Figuras 15 (a e b) e 16 (a e b) são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção na região do UV (250-280 nm) e os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda na região UV em estudo.

Os resultados encontrados em ambos os equipamentos confirmam o comprimento de onda de máxima absorção, 278 nm, para a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e

sulfadimetoxina. Para sulfatiazol, embora a máxima absorção não ocorra em 278 nm, resultados satisfatórios foram obtidos neste comprimento de onda, justificando a escolha deste comprimento de onda para os quatro compostos em estudo.

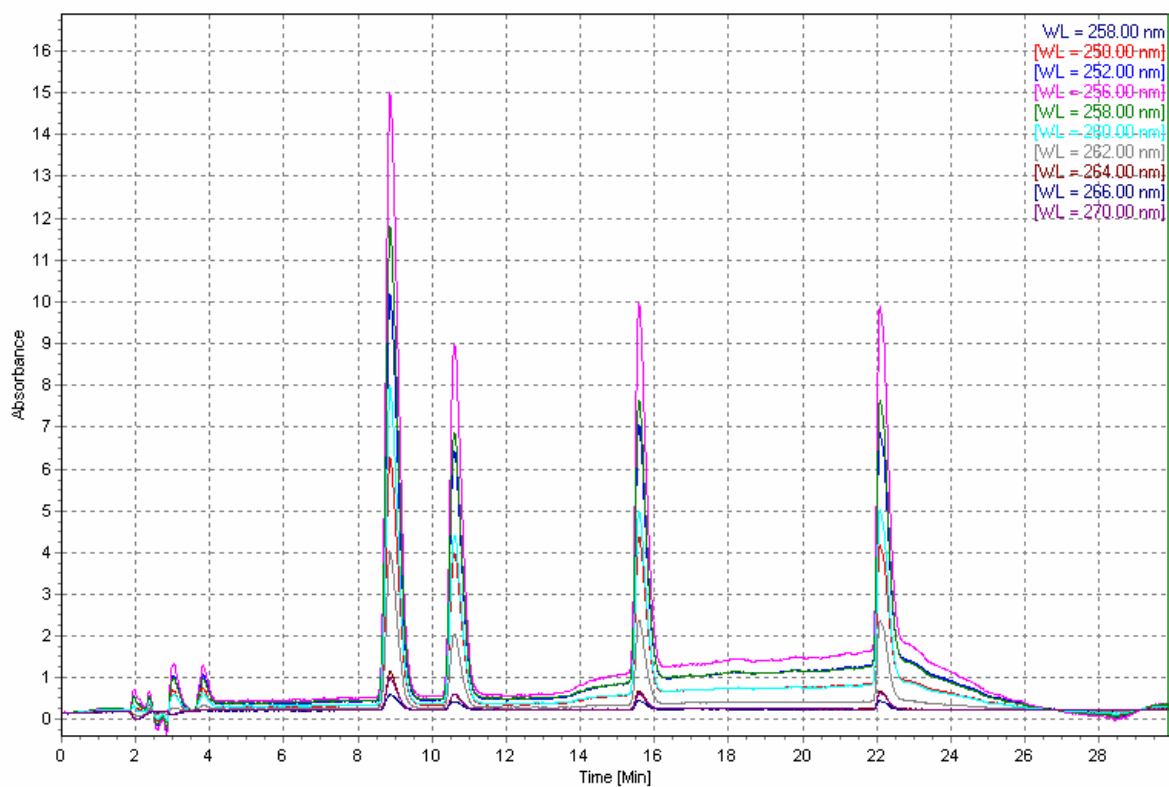


(a)

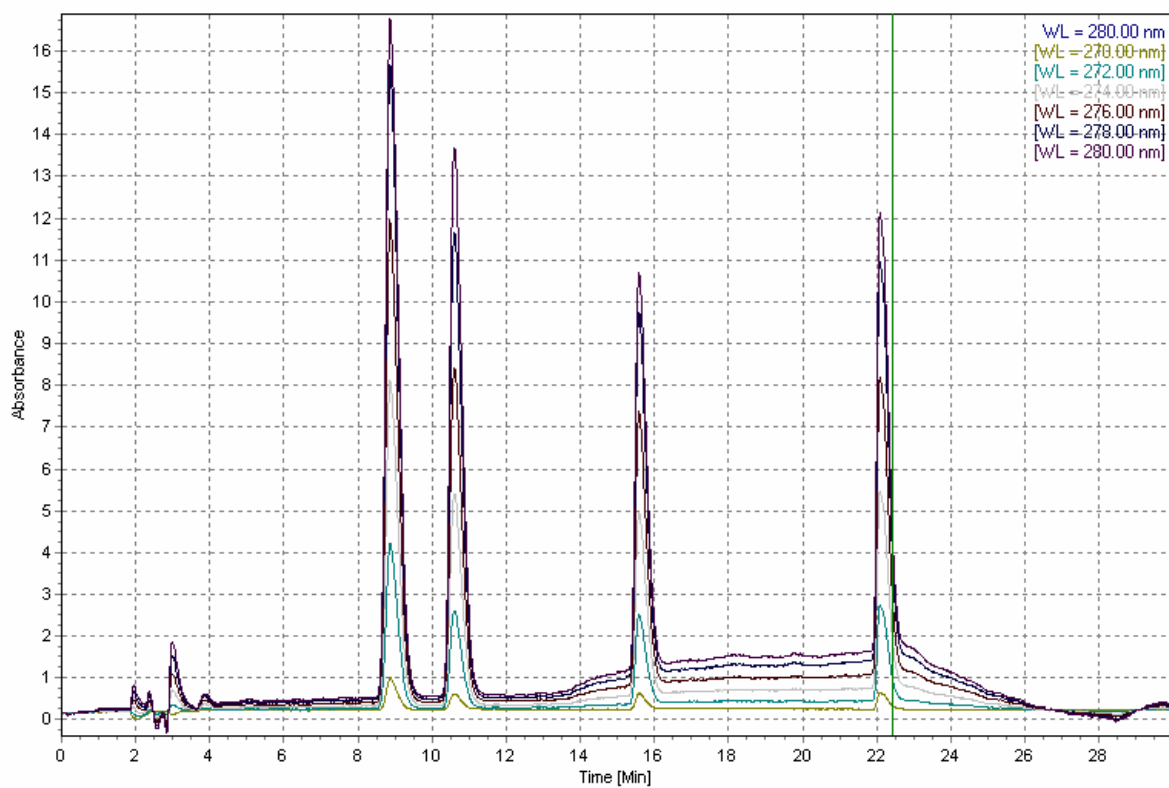


(b)

Figura 15 - Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.



(a)



(b)

Figura 16 - Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatográfico: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm

6.2 SELEÇÃO DA COLUNA

Para se obter uma melhor separação cromatográfica foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas duas colunas analíticas, uma com fase C_8 (mais polar), e com uma coluna C_{18} (menos polar). Com ambas as colunas obteve-se uma boa resolução e boa separação dos compostos de interesse. A Figura 17 mostra uma sobreposição dos cromatogramas resultantes da injeção da mistura dos padrões em concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Selecionou-se a coluna C_{18} em função dos maiores valores de áreas dos picos das sulfonamidas, confirmando-se os dados encontrados na literatura que citam maior utilização da coluna C_{18} .

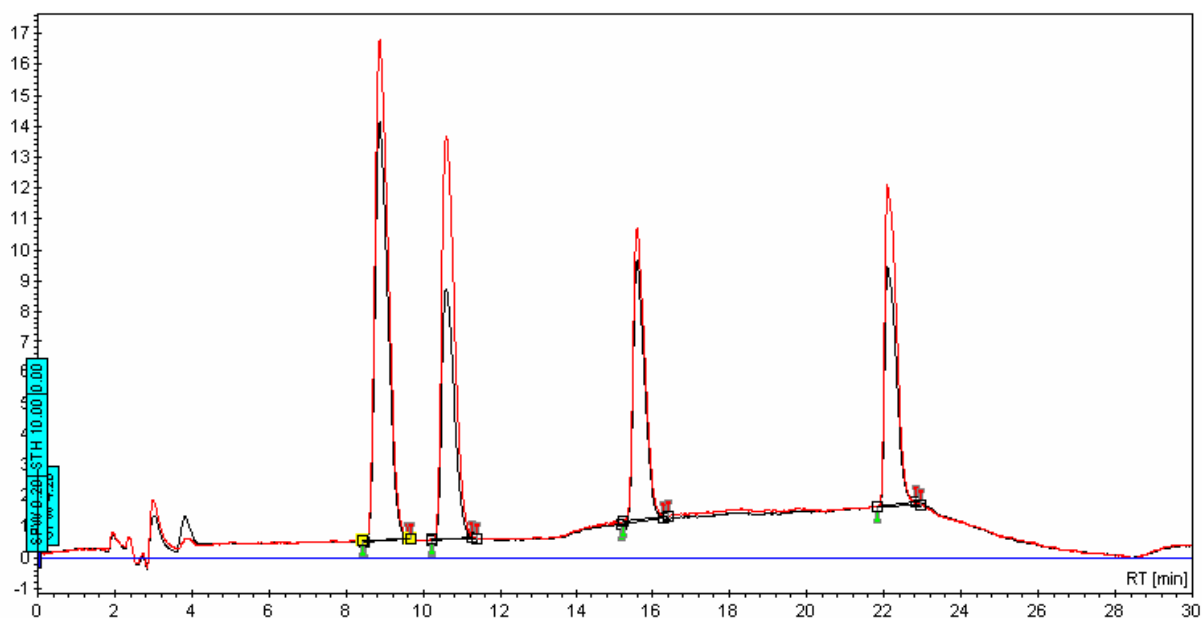


Figura 17 - Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando C_{18} (cromatograma vermelho), C_8 (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).

6.3 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é muito importante na separação dos analitos devido à interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a proporcionar uma resolução adequada dos analitos, boa separação, menores tempos de

retenção, mantendo, entretanto, a solubilidade dos analitos no decorrer da separação cromatográfica e, principalmente, sem interferir na detecção dos analitos de interesse.

6.3.1 Seleção do pH da fase móvel

As sulfonamidas estudadas apresentam caráter anfótero (solubilidade entre 1 e 192 mg/100mL de água a 27°C) e valores de pK_a entre 6,21 e 7,45. Vários trabalhos na literatura apontam o uso de solução-tampão de acetato de sódio (pH 4,5) na fase móvel, justificando que seu uso mantém as espécies iônicas estáveis no decorrer das análises. A escolha do pH da solução-tampão constitui-se, então, em um fator importante. Foram feitos testes para verificar em qual pH as sulfonamidas estudadas teriam a melhor resposta no detector DAD. Os valores de pH testados foram: 3,5; 4,5 e 5,5, como apresentado na Figura 18. Para a realização dos testes de pH utilizou-se acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Em todos os valores de pH obteve-se boa separação e resolução. Entretanto, em pH 4,5 melhores resultados foram obtidos, quando se comparando as áreas dos picos nos três valores de pH.

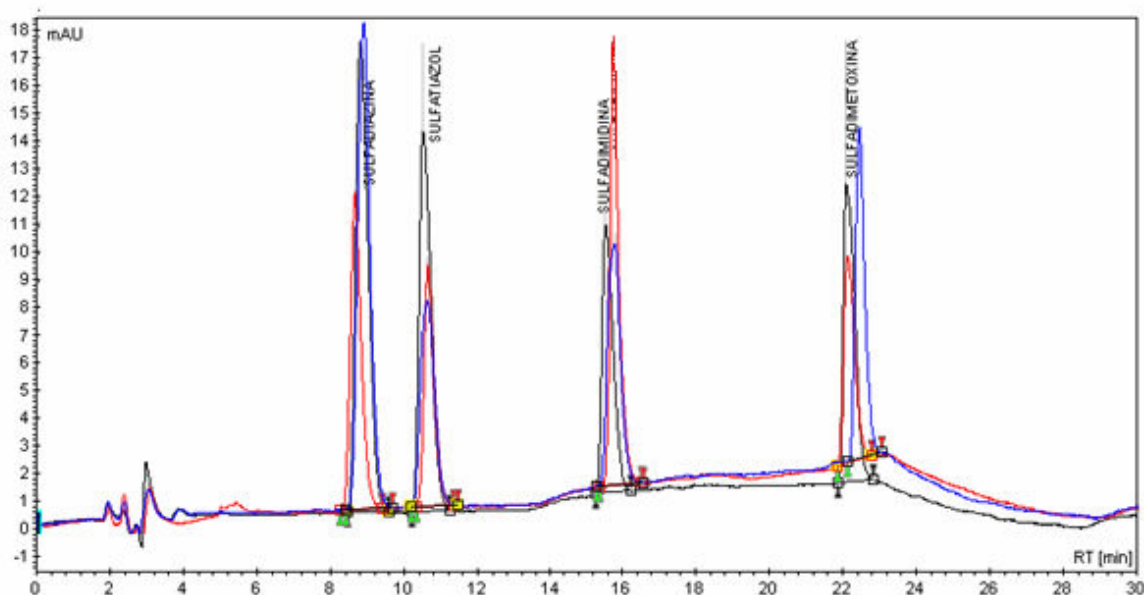


Figura 18 - Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto)

6.3.2 Composição da fase móvel

No Quadro 4 são apresentados os testes realizados no estudo da composição da fase móvel.

Teste	Gradiente			Composição da Fase móvel	
	t (min)	%	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
Teste 1	0	10:90	1,0	Metanol	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 2	0	10:90	1,0	Metanol	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 3	0	10:90	1,0	Metanol	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 4	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 5	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 6	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			

*t – tempo em minutos; % - proporção de solvente

Quadro 4 - Testes para seleção da composição da fase móvel

Quando metanol foi empregado na fase móvel, independente da composição da fase aquosa, não foi possível observar todos os picos das sulfonamidas injetadas. Em todos os

testes em que foi utilizado este solvente, observou-se somente os picos da sulfadiazina, sulfatiazol e sulfadimidina, não sendo identificando sinal para sulfadimetoxina. Este fato pode ser explicado em função do poder de arraste do metanol, que não deve ter sido suficiente para detectá-la nas condições estabelecidas. Os resultados dos testes feitos com tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e solução de ácido acético 0,1% apresentaram áreas dos picos maiores que as obtidas quando utilizando água na fase móvel. Na Tabela 7 são apresentados a quantidade e os respectivos compostos separados no estudo da composição da fase móvel. Os cromatogramas típicos obtidos com os melhores resultados para cada teste de composição da fase móvel são apresentados nas Figuras 19, a e b.

Para os testes empregando-se acetonitrila, melhores resultados foram encontrados para todas as composições da fase móvel. Utilizando-se ACN: solução de ácido acético 0,1% e ACN: tampão acetato de sódio pH 4,5, resolução e separação adequadas foram observadas para as quatro sulfonamidas. Acetonitrila e água apresentaram melhores resultados sendo, assim, selecionados como os solventes adequados para a fase móvel (Figura 19 - b).

No ANEXO 03, são apresentados todos os cromatogramas dos testes realizados nos estudos da composição da fase móvel.

Tabela 7 – Estudo da composição da fase móvel.

Teste	Quantidade de compostos separados	Compostos separados
01 (MeOH:H ₂ O)	03	SDZ, STZ, SDD
02 (MeOH:TAMPÃO)	03	SDZ, STZ, SDD
03 (MeOH:ÁGUA ÁC 0,1%)	03	SDZ, STZ, SDD
04 (ACN:H ₂ O)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
05 (ACN:TAMPÃO)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
06 (ACN: ÁGUA ÁC 0,1%)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM

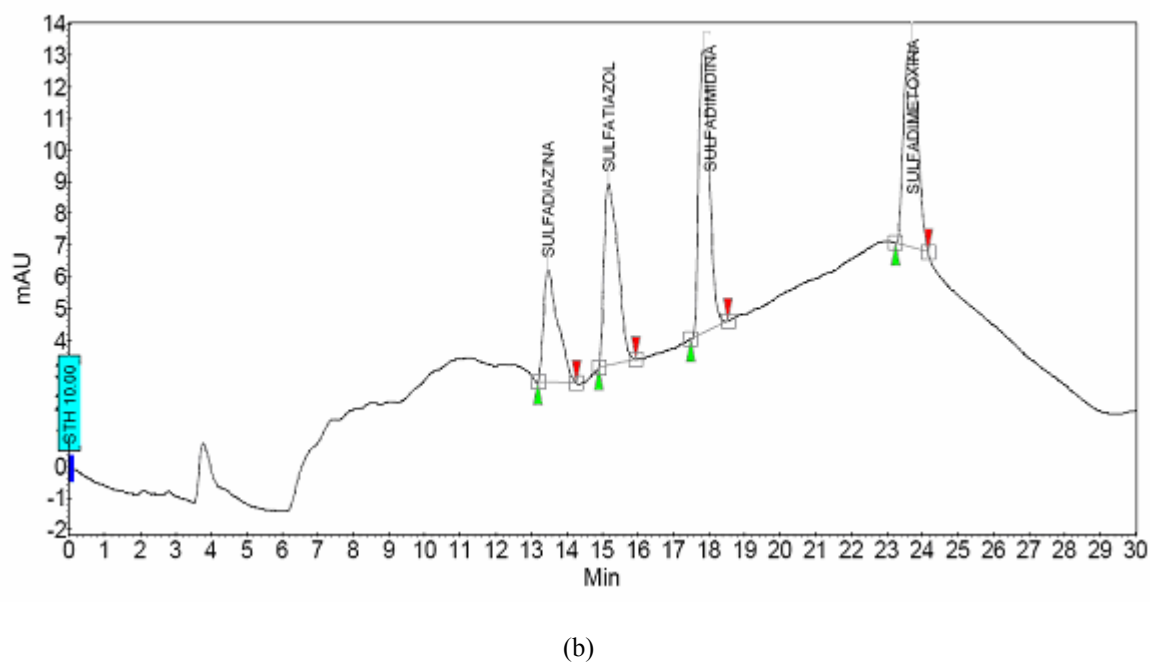
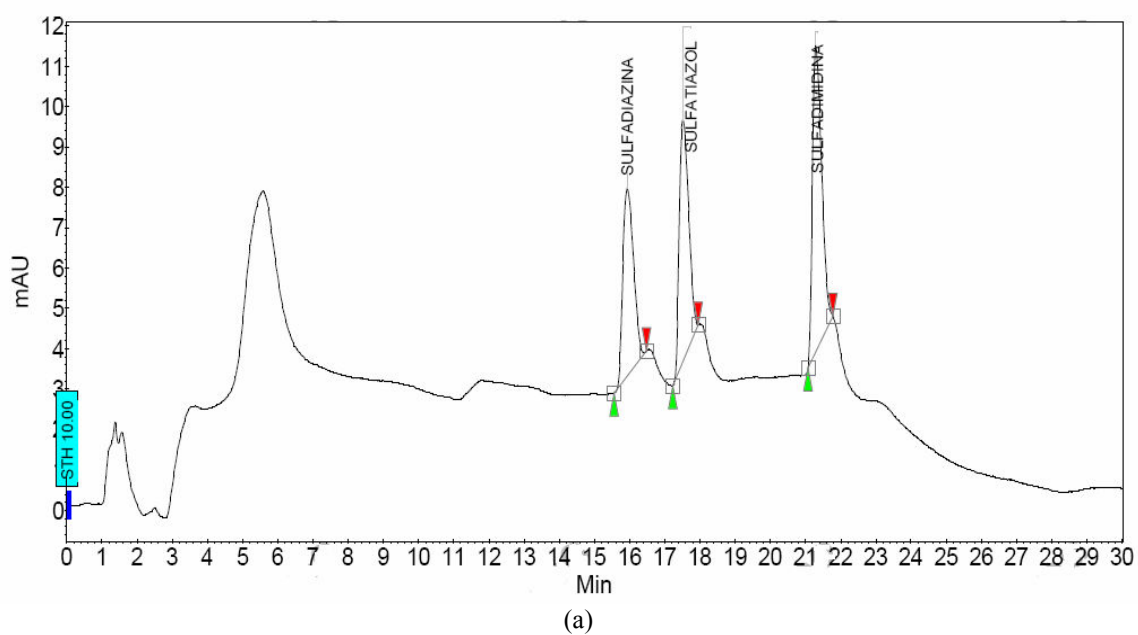


Figura 19 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água

6.3.3 Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho

As sulfonamidas são compostos ligeiramente solúveis em água, e apresentam maior solubilidade em soluções ácidas ou básicas e em solventes orgânicos [9]. Segundo Sun *et al.* [9], a solução de ácido acético 0,1% quando utilizada como solvente para as soluções de trabalho, proporciona picos cromatográficos mais definidos. Para Pecorelli *et al* [18], as soluções de trabalho devem ser preparadas usando-se solução tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, uma vez que favorecem a estabilidade das sulfonamidas.

Para se obter resolução e separação cromatográfica adequadas foram testados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho. Dois testes foram realizados, utilizando-se solução-tampão de acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e utilizando-se solução de ácido acético 0,1%. Para ambos os solventes foram obtidos resultados satisfatórios, entretanto, a solução tampão (Figura 20) forneceu maiores áreas dos picos cromatográficos, tendo-se optado por este solvente para a realização das demais análises.

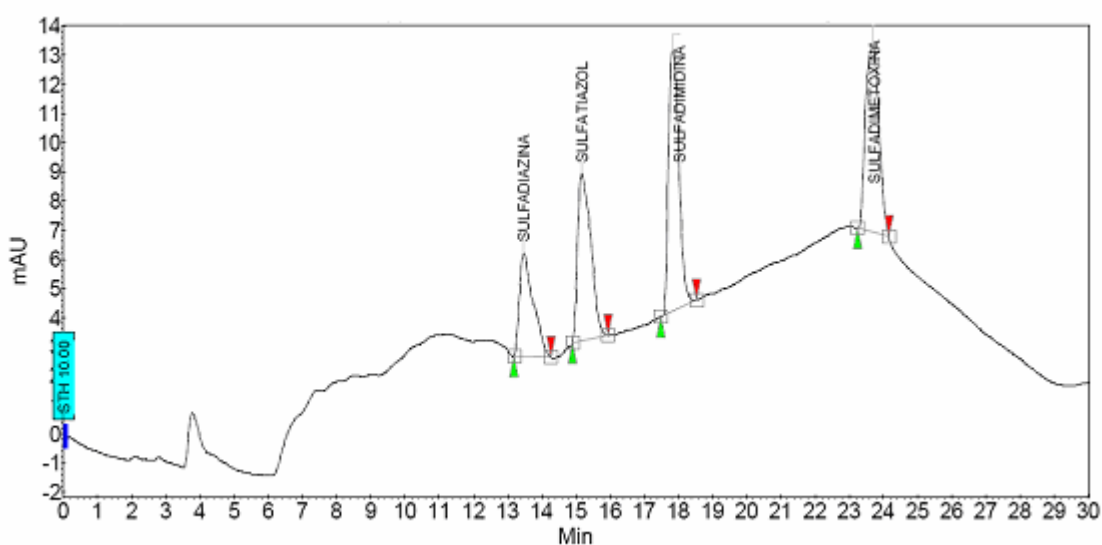


Figura 20 - Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5.

Outro teste realizado foi a otimização do tempo de análise. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação e a resolução dos picos, o fluxo da fase móvel foi variado de $0,4$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados demonstraram que quanto menor o fluxo da fase móvel sulfadiazina e sulfatiazol apresentam tempos de retenção bem próximos dificultando a

separação dos picos. Em fluxos maiores ocorre uma melhor separação. O fluxo de 1 mL min⁻¹, apresentou os melhores resultados podendo-se observar separação dos picos satisfatória.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Depois de selecionadas as condições cromatográficas foram realizados cinco repetições em concentração 1,0 mg L⁻¹ para cada sulfonamida, com os melhores resultados dos testes anteriores. Na Tabela 8 são listadas as condições cromatográficas selecionadas. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 8 - Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.

Item	Condições
Equipamento	CLAE-DAD
Coluna	CL-18, 150mm x 4,6mm, 4µm - Phenomenex
Coluna de Guarda	KJO-4282 – Phenomenex
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Água
Proporção dos solventes	10:90
(A:B)	15:85
	30:70
	40:60
	15:85
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	278 nm

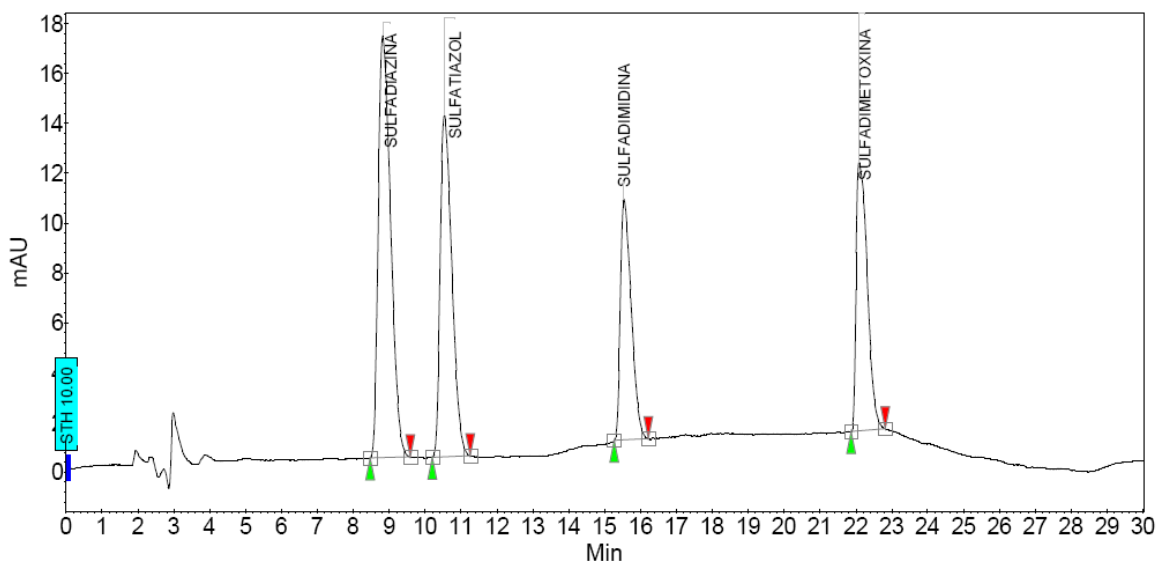


Figura 21 - Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

A estabilidade dos padrões também foi avaliada nesta etapa. A avaliação da estabilidade das soluções intermediárias utilizadas na metodologia analítica foi realizada com o objetivo de verificar a ocorrência de degradação do analito. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos padrões durante a estocagem a -10°C em um período de 3 meses. As amostras foram analisadas após 1 semana, 1, 2 e 3 meses. Definiu-se como critério de aceitação variações menores que 20% em relação à concentração inicial, levando-se em consideração possíveis alterações ocasionadas pelo próprio armazenamento.

Verificou-se que a estabilidade dos padrões é mantida por até 3 meses e 7 dias, após esse período a concentração dos padrões sofre uma perda média do analito de aproximadamente 40 %. A Figura 22 apresenta um gráfico com a percentagem de degradação das soluções-padrão.

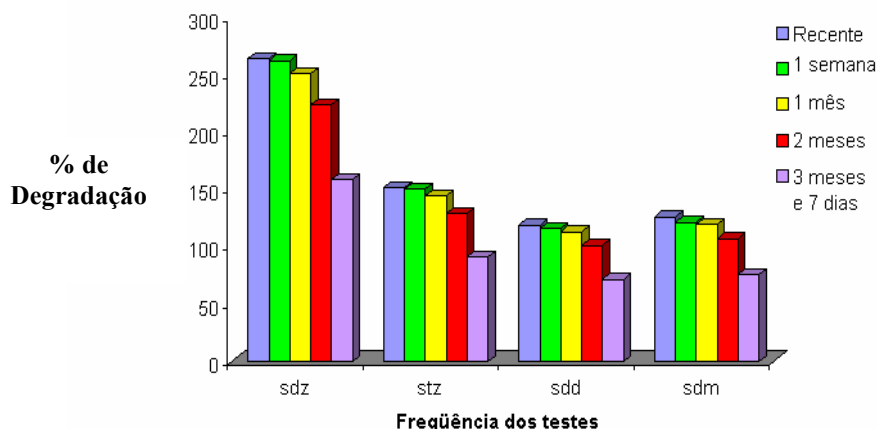


Figura 22- Estudo da degradação das soluções-padrão

6.5 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS

A metodologia de extração utilizada neste trabalho baseou-se em estudos de; SUN *et al.* [9]; BISWAS *et al.* [71]; WANG *et al.* [67]; ZOTOU e VASILADOU [11]; MAUDENS, ZHANG E LAMBERT [63]; PECORELLI *et al.* [18]; MARTEL e ZEGANNE [64]; PANG *et al.* [65]; CANCHO-GRANDE *et al.* [116]; FURUSAWA [14]; STOEV & MICHAILOVA [80]; VIÑAZ *et al.* [86]; HORIE *et al.* [66].

Os testes foram realizados utilizando-se extrato de mel, preparado pela diluição de 1,0 g de mel em água + solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (amostra sem hidrólise ácida) e extrato hidrolisado de mel (1,0 g de mel + solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}). Foram utilizados volumes de 100,0 mL de amostras fortificadas com as sulfonamidas de interesse. Para os testes preliminares utilizou-se nível de fortificação de 50 ng g^{-1} de cada sulfonamida. A extração foi realizada em triplicata e as injeções cromatográficas também foram feitas em triplicata. Avaliou-se a recuperação de cada composto após os procedimentos de extração, comparando-se com a injeção, direta dos padrões das sulfonamidas. Uma vez estabelecidas as condições, novos testes foram realizados, utilizando-se três níveis de fortificação (25 , 50 e 100 ng g^{-1}).

6.5.1 Pré-tratamento da amostra

Em síntese, podemos definir o mel como um produto açucarado, constituído em sua maioria por açúcares. As sulfonamidas têm como característica formarem ligações com açúcares, principalmente ligações com açúcares redutores, podendo formar uma variedade de diferentes compostos açúcar-sulfonamida [114] o que poderia modificar o comportamento dos picos cromatográficos pelo efeito de matriz. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre açúcar e sulfonamida, estudada por Sheth *et al.* [114]. No citado estudo, realizou-se uma reação de uma molécula de sulfatiazol com uma molécula de açúcar redutor, ocorrendo a formação de uma base de Schiff (n-glucosilamina) e liberação de uma molécula de água, formando-se em seguida um composto de Amadori e, após um longo período de armazenamento, o autor comenta a possibilidade de formação de outros produtos da reação de Maillard. O referido autor cita também que sobre condições ácidas a tendência é a formação de sulfonamidas livres devido a ionização do grupo amina. O autor ainda afirma que a ligação de açúcares-sulfatiazol poderá ocorrer com outras sulfonamidas também.

Schwaiger e Schuch [115] estudaram e provaram que para a determinação de sulfonamidas em mel é necessário uma etapa de hidrólise ácida antes da análise cromatográfica para quebrar as ligações açúcar-sulfonamida. Observaram também que após a hidrólise ácida é necessário realizar um ajuste no pH do meio para 4,5 para que as sulfonamidas permaneçam estáveis no meio.

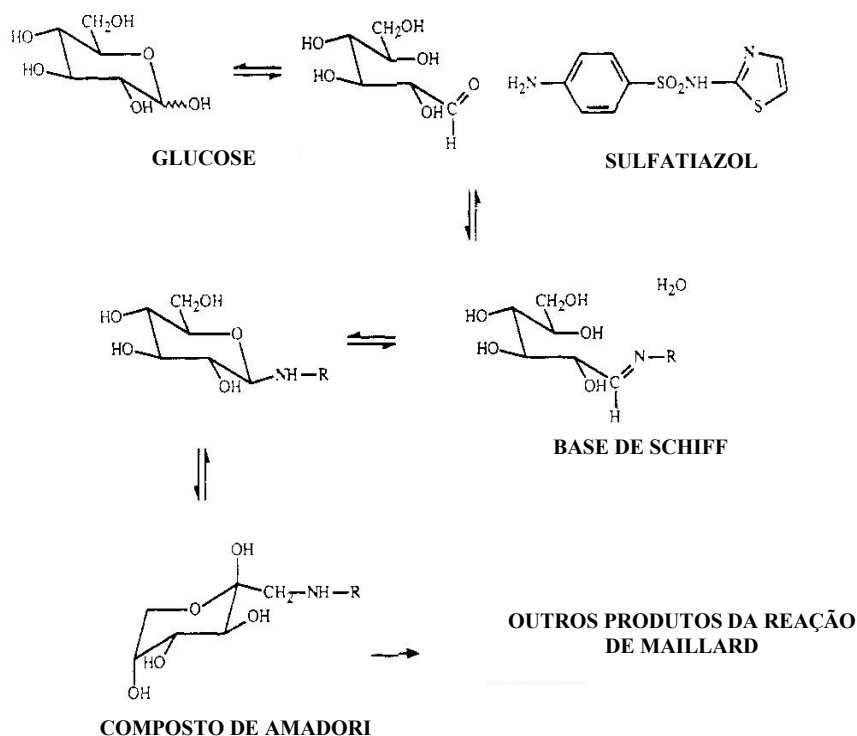


Figura 23 – Esquema da reação açúcar-sulfonamida.
 Fonte: adaptado de [114].

Inicialmente foram realizados testes para selecionar as melhores condições para o pré-tratamento da amostra. Na Tabela 9 são apresentados os testes realizados.

Tabela 9 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

Após definidas as condições para a hidrólise foram realizados dois testes com a matriz. O primeiro consistiu somente na diluição de 1,0 g de mel em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5, neste caso não utilizou-se hidrólise ácida. O segundo teste consistiu na realização de uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico, como descrito na seção 5.3.2.1. Os resultados dos testes de hidrólise mostraram que as variáveis que mais influenciam na eficiência da hidrólise ácida são concentração e volume de ácido adicionado e tempo de agitação. A forma de agitação influencia, mas não como as outras variáveis. A concentração do ácido mostrou ser uma variável muito importante, sendo a concentração de 2M a mais eficiente. O volume de ácido adicionado influencia tanto na dissolução quanto na eficiência da hidrólise. O tempo de agitação também está diretamente ligado à eficiência da hidrólise. O conjunto de condições: concentração de 2M e tempo de 30 minutos, apresentou bons resultados, mas não melhores dos que os apresentados na mesma concentração e tempo de 45 minutos.

Das condições estudadas, os melhores resultados foram os obtidos pelo seguinte conjunto: concentração de 2M, 2 mL de ácido e 45 min. O volume de 2 mL propiciou melhores resultados, no entanto, dificulta a dissolução do mel, tendo-se optado pela adição de volume de 5 mL. A agitação em banho ultra-som foi escolhida por apresentar resultados um pouco melhores do que os encontrados com o uso da mesa agitadora. Nas Figuras 24 - a e b, são apresentados os cromatogramas correspondentes a este teste. Pode-se observar através das Figuras que sem hidrólise do mel ocorreram muitos ruídos, porém a evidência mais importante é que não foram observados os picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas de interesse. Na amostra testemunha fortificada foram observados vários picos interferentes em tempos de retenção próximos aos dos picos das sulfonamidas de interesse. A

ocorrência destes picos cromatográficos pode ocasionar diminuição nas áreas dos picos cromatográficos das sulfonamidas de interesse o que pode levar a resultados errados. Na Figura 24 b é apresentado um cromatograma típico de uma amostra de testemunha fortificada sem passar por uma etapa de hidrólise ácida.

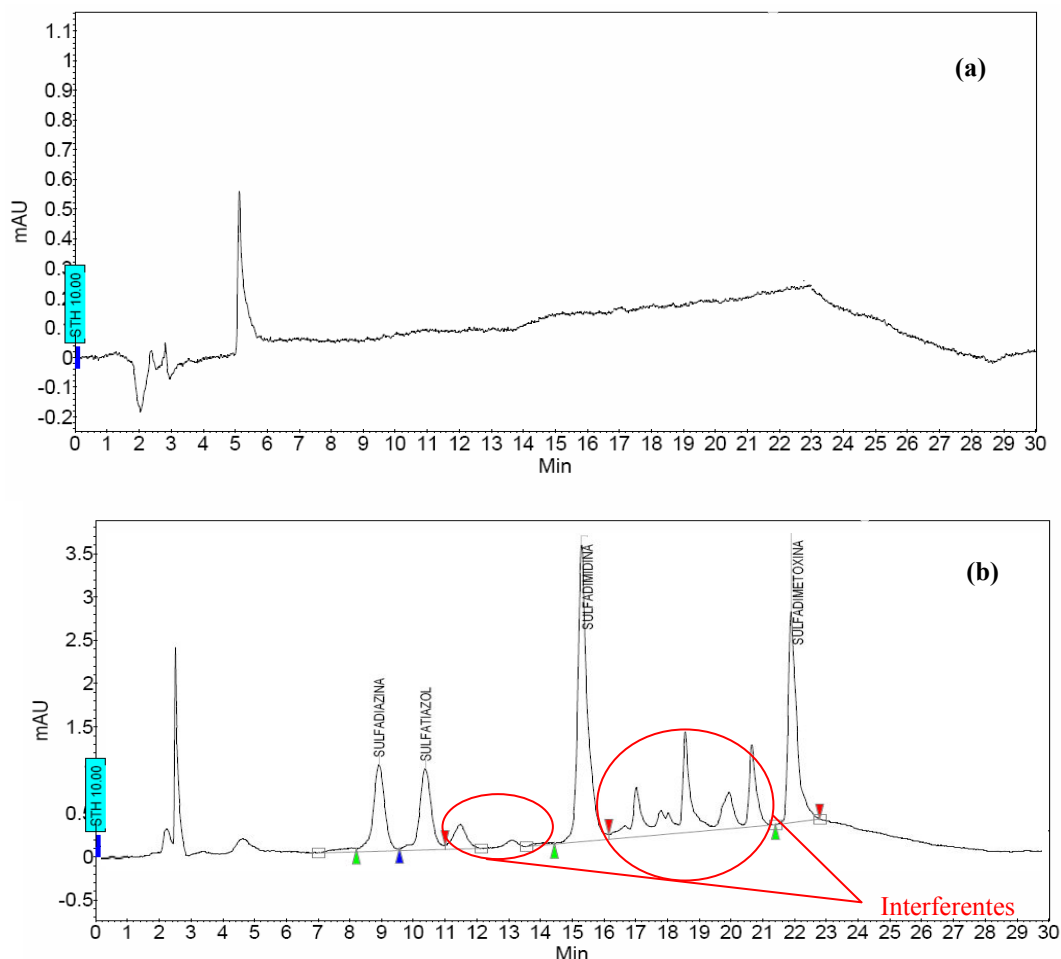


Figura 24 - Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹, sem hidrólise ácida.

De um modo geral, todos os testes de hidrólise mostraram-se etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. Para o mel submetido à etapa de hidrólise ácida, foi possível perceber melhora do ruído no cromatograma, não sendo também observados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Os melhores resultados são mostrados nas Figuras 25 - a e b.

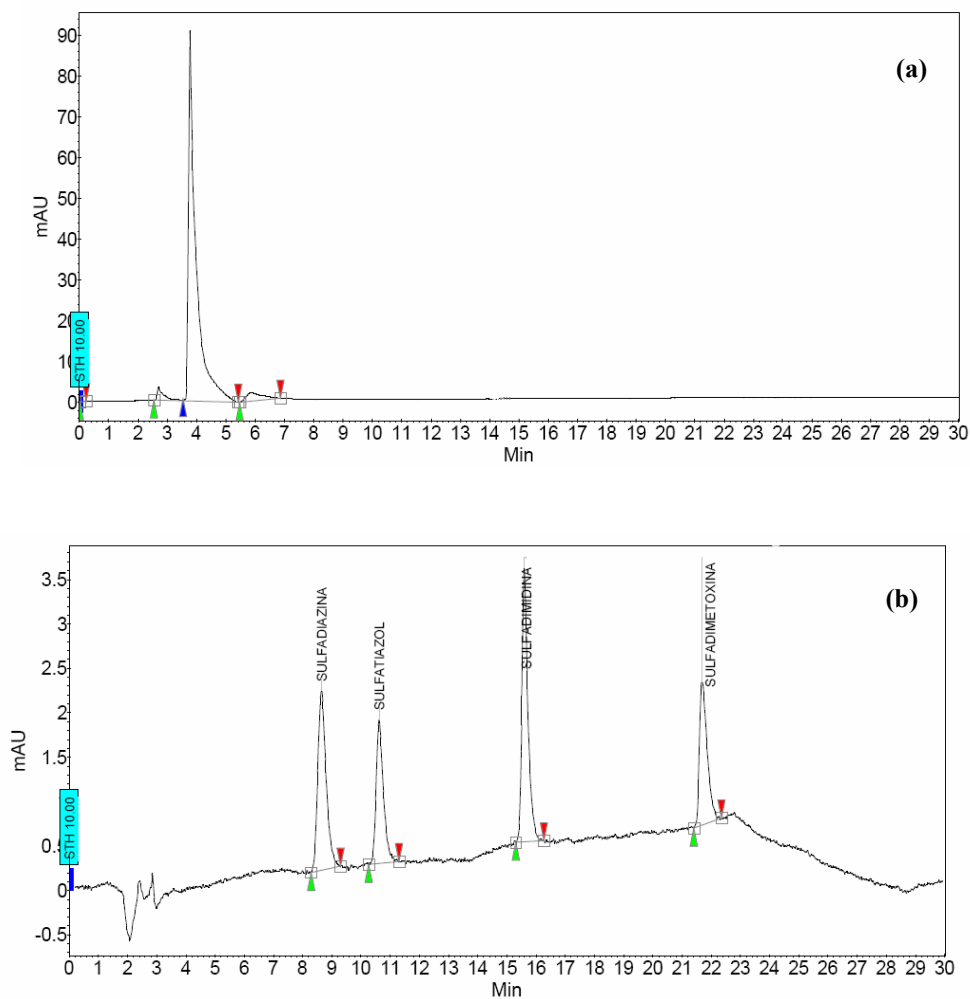


Figura 25 - Cromatogramas obtidos nos testes de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , com hidrólise ácida.

Pode-se evidenciar por este estudo a importância da etapa de hidrólise ácida, observando-se no cromatograma sem hidrólise a presença de vários picos interferentes próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, o que levou a uma redução das áreas dos picos dos compostos. Com a amostra de mel submetida à hidrólise ácida o cromatograma quase não evidenciou interferentes, tendo apresentado separação adequada dos picos das sulfonamidas.

6.5.2 Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração por fase sólida

Os testes realizados para escolha do adsorvente, solvente para condicionamento do cartucho e solvente para eluição tiveram por objetivo escolher o conjunto de condições que oferecessem a melhor eficiência na extração, ou seja, os melhores resultados de recuperação. As recuperações obtidas na extração de compostos nos níveis de concentração estudados deve ser entre 70-120%. As fases e condições utilizadas nas extrações são citadas na Tabela 10.

Cabe mencionar, que a eficiência da extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na amostra de mel fortificada em relação ao analito em solução padrão.

Tabela 10 - Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)

Teste	Cartucho	Condicionamento
Teste 1	C-8	MA/MAT/AA/AAT*
Teste 2	C-18	MA/MAT/AA/AAT
Teste 3	Nexus	MA/MAT/AA/AAT

***MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.**

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos testes de eficiência de extração. Quando metanol foi utilizado como solvente de eluição recuperações inferiores a 70% foram obtidas.

Tabela 11 - Resultados dos testes de eficiência de extração

Analito	Eluente	Eficiência da extração (% de recuperação)											
		C8 (teste 1)				C18 (teste 2)				Nexus (teste 3)			
		MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT
SDZ	MeOH	42	41	49	48	53	64	56	60	57	60	62	65
	ACN	61	67	65	70	66	70	68	73	73	79	80	84
	Tampão	58	62	61	62	67	73	70	76	73	77	79	83
STZ	MeOH	39	45	40	48	55	51	51	56	51	58	56	59
	ACN	56	60	55	65	62	64	63	71	60	67	75	84
	Tampão	51	60	55	60	55	63	66	70	62	66	68	76
SDD	MeOH	42	45	44	47	55	61	64	63	53	60	53	63
	ACN	60	65	62	66	63	68	67	66	72	76	74	79
	Tampão	62	64	63	57	66	72	74	68	64	69	70	78
SDM	MeOH	43	47	42	45	51	59	54	61	55	58	52	61
	ACN	60	63	62	67	70	64	67	63	73	76	66	79
	Tampão	55	58	56	58	72	75	74	78	71	74	78	82

Analisando-se os resultados da Tabela 11, observa-se que os cartuchos Nexus proporcionaram recuperações, de 51 a 65%, em todos os tipos de condicionamento realizados. Para os cartuchos C18, as recuperações variaram entre 51-64%. Com cartucho C8 menores recuperações foram obtidas de 41-49%, supondo-se problemas com a polaridade da fase.

Dos condicionamentos testados, os solventes acetonitrila/água/tampão foram os que apresentaram melhores resultados para todos os cartuchos. A utilização de tampão no condicionamento proporcionou melhores resultados. Os solventes metanol/água foram a sequência que apresentaram menores valores de recuperação.

Para a eluição, verificou-se que, com acetonitrila, as recuperações foram melhores dos que as obtidas quando metanol foi utilizado como solvente de eluição dos analitos. As recuperações encontradas foram de 51-84%. Analisando-se os resultados dos testes utilizando-se acetonitrila como eluente, observou-se que com cartuchos Nexus, melhores recuperações foram também obtidas (60-84%). O cartucho C18 também apresentou resultados satisfatórios (62 a 73%). Para o cartucho C8, menores recuperações (55-70%) foram obtidas.

As extrações utilizando tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹), pH 4,5 e adição de 1% de metanol como eluente para os analitos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com acetonitrila. As recuperações para os cartuchos Nexus foram de 62-83%. Já

para o cartucho C18 foram de 55-79% e para o cartucho C8 as recuperações foram de 51-62%.

Com base nos resultados encontrados, quanto ao material que constitui a fase sólida do cartucho, pode-se observar que o cartucho Nexus apresentou uma maior interação com as moléculas dos analitos dos que as fases sólidas C8 e C18 obtendo-se melhores resultados em todos os testes. Os resultados dos testes realizados com os cartuchos C8 não foram satisfatórios para nenhuma das condições testadas. Pressupõe-se que a polaridade da fase possa ter interferido na extração. E como eluente a acetonitrila apresentou os melhores resultados, incluindo secagem mais rápida sob fluxo suave de nitrogênio.

Objetivando-se promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes também foram realizados dois testes de *clean-up*, ambos utilizando-se cartuchos de *Florisil*, 500 mg/6mL. O primeiro teste (*clean-up* 1) foi realizado com 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila e o segundo teste (*clean-up* 2) foi realizado com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após a passagem das amostras pelos cartuchos de *Florisil*, submeteu-se a fluxo suave de nitrogênio até a secura. As amostras foram retomadas com 1 mL de acetonitrila e injetadas. A Figura 26 apresenta os resultados dos testes de % de recuperação das quatro sulfonamidas estudadas com as duas condições de *clean-up* testadas.

Dentre os procedimentos empregados, o que demonstrou maior recuperação do analito foi o que empregou 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila. No entanto, estes resultados não foram melhores do que os obtidos quando não realizado procedimento de *clean up* com cartuchos de *Florisil*, optando-se, portanto pela não utilização deste passo nas demais análises para a determinação de sulfonamidas em mel.

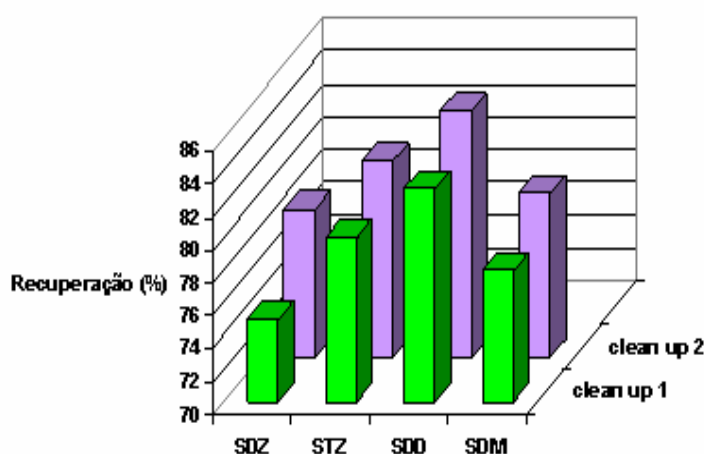


Figura 26 - Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de *clean-up*.

Depois de selecionadas todas as condições de extração, foram realizados novos experimentos de extração, em triplicata, em três níveis de concentração: 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para otimizar as condições de extração do método desenvolvido. Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração selecionadas.

Tabela 12 – Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.

Composto	Concentração		
	25 ng/g	50 ng/g	100 ng/g
SDZ			
Rec±RSD, (%)	80 ± 12,50	83 ± 8,43	85 ± 5,88
STZ			
Rec±RSD, (%)	71 ± 15,49	76 ± 11,84	80 ± 7,50
SDD			
Rec±RSD, (%)	77 ± 12,99	81 ± 9,88	83 ± 6,02
SDM			
Rec±RSD, (%)	75 ± 13,33	79 ± 10,13	81 ± 6,17

*n=3

Na Figura 27 é apresentado o cromatograma no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹ obtido após estabelecimento das condições de extração.

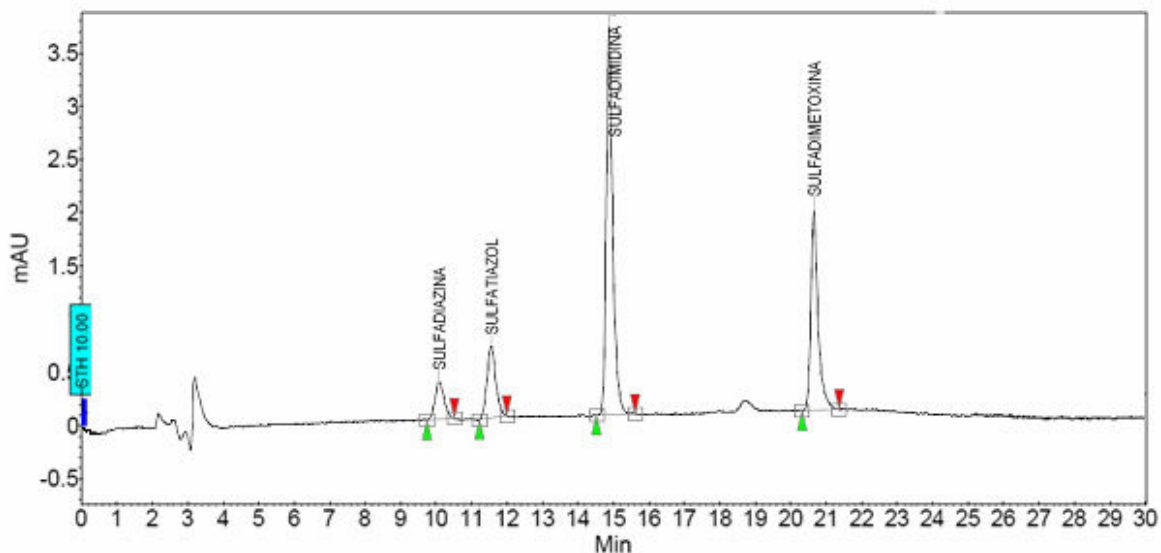


Figura 27 - Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas e otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica, como no preparo da amostra para a determinação das sulfonamidas por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de sulfonamidas no mel. Antes da validação, verificou-se a conformidade do sistema seguindo as recomendações da *Food and Drug Administration* – FDA, 2004.

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

6.6.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros da conformidade do sistema avaliados: número de pratos (N), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As), estão de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas vigentes e foram obtidos satisfatoriamente. Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos dos parâmetros para verificação da conformidade do sistema cromatográfico.

Tabela 13 - Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico

Sulfonamidas	t _R	N	k	Rs ^(*)	As
SDZ	8,45	8002,23	1,6	3,0	1,04
STZ	10,33	8710,16	2,8	6,74	1,25
SMZ	15,24	12014,63	3,4	8,44	1,20
SDM	22,09	26853,47	4,0	11,41	1,00

t_R – tempo de retenção das sulfonamidas; N – número de pratos teóricos; k – fator de retenção; Rs – resolução; As – fator de assimetria

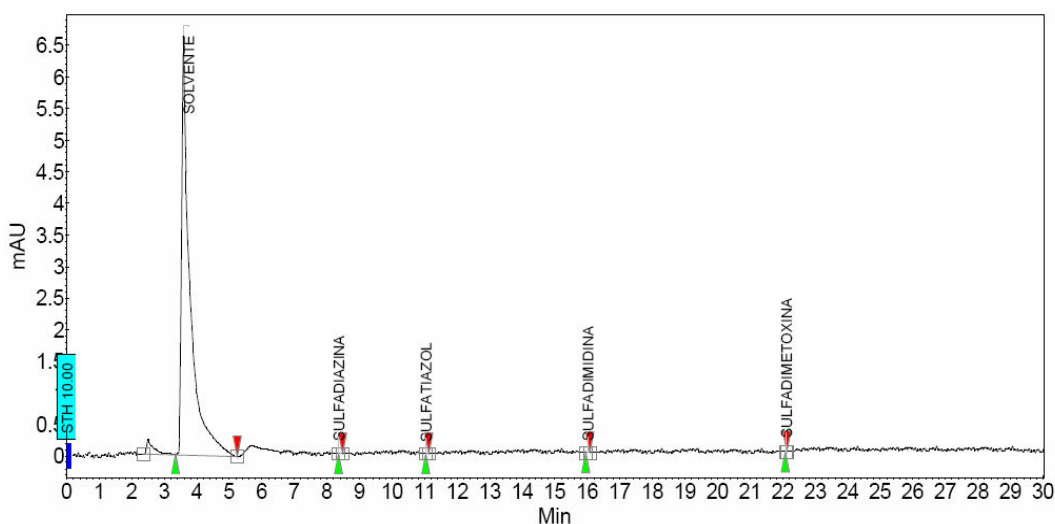
(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes.

Considerando-se as condições citadas por SHABIR [113]: $1 \leq k \leq 10$; $Rs > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

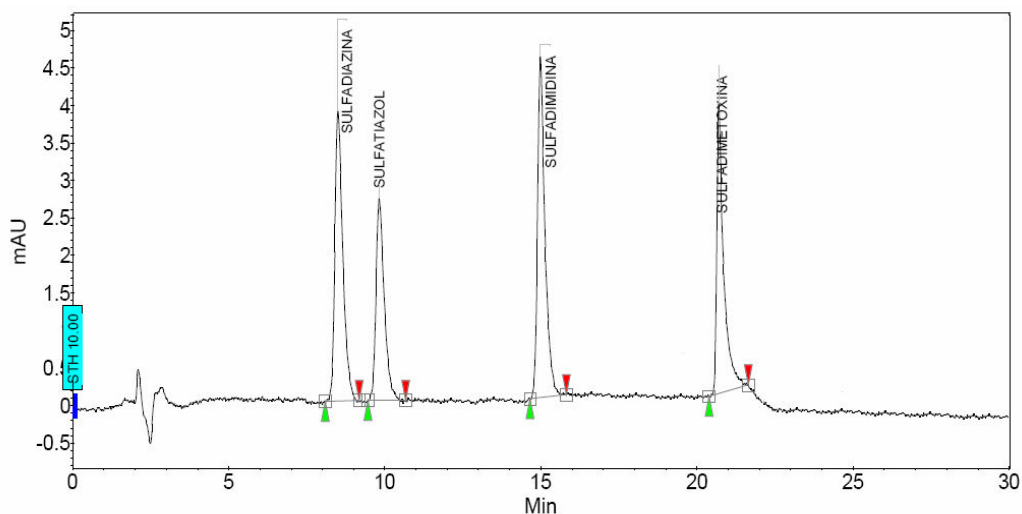
6.6.2 Seletividade

O estudo da seletividade do método teve como objetivo quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no mel. A seletividade foi testada analisando-se o extrato da amostra testemunha (extrato contendo só mel) e o extrato da amostra testemunha fortificado com as sulfonamidas (extrato contendo mel fortificado com as sulfonamidas).

No extrato da amostra testemunha não foram observados picos interferentes referentes aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, durante toda a separação cromatográfica. Foram observados apenas sinais característicos do solvente. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28 - a e b.



(a)



(b)

Figura 28 - Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.

Segundo a ANVISA não são recomendados que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito sejam superiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Como verificado na Figura 31, não existem picos interferentes, conclui-se, portanto, que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

6.6.3 Curva analítica

Foram construídas curvas analíticas, com soluções-padrão. As curvas analíticas com os padrões foram feitas com cinco injeções sucessivas (em quintuplicata), de cada ponto das curvas (25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$), sempre da menor para a maior concentração, sendo utilizada a média das leituras para a construção das curvas.

As curvas foram construídas plotando-se a área do pico *versus* a concentração do analito (Figura 29), onde y é a resposta em unidades de área e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

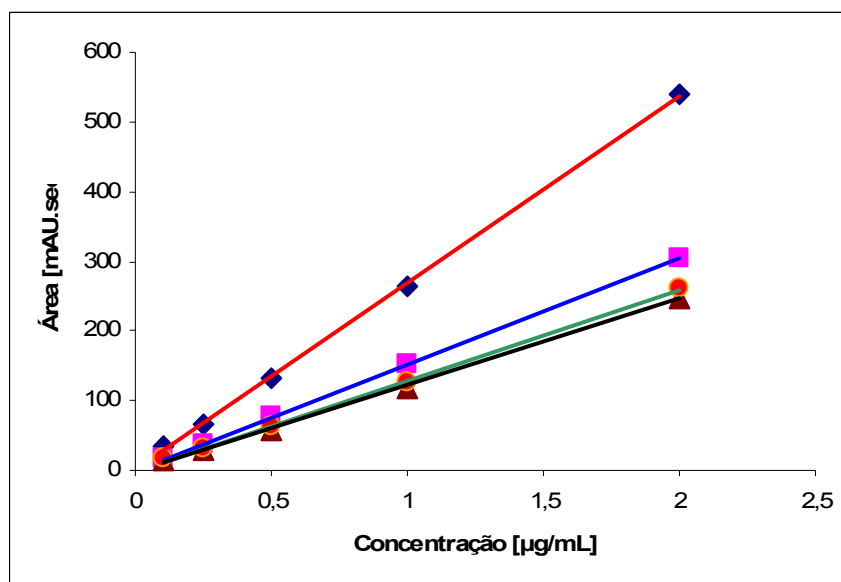


Figura 29 – Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).

Os valores das leituras foram submetidos a tratamentos estatísticos para obtenção dos coeficientes de correlação (r^2) e as equações das retas de cada sulfonamida pela extrapolação dos dados com o uso do *software Origin 6.0* e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão

Sulfa	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação de regressão	Coeficiente de correlação (r^2)
SDZ	0,025-2,0	$3,5754x - 0,021$	0.9990
STZ	0,025-2,0	$2,9936x - 0,043$	0.9996
SDD	0,025-2,0	$2,3462x - 0,019$	0.9994
SDM	0,025-2,0	$2,2321x - 0,063$	0.9983

Os coeficientes de correlação encontrados, todos superiores a 0,9900, demonstraram que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração estudado. Os resultados encontrados estão de acordo com as recomendações da ANVISA [58] para a validação de métodos analíticos.

6.6.4 Faixa linear, linearidade, sensibilidade

Para todo método existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,9900. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

A linearidade da resposta foi determinada através da habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear.

A sensibilidade foi estudada como a resposta do detector em função da concentração do analito, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

6.6.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das soluções-padrão das sulfonamidas em concentração decrescentes. Os limites de

detecção e quantificação foram calculados através das relações sinal/ruído. Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação.

6.6.6 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g⁻¹). O nível de fortificação utilizado nesta pesquisa baseou-se no LMR estabelecido pelo PNCR, do MAPA.

Tabela 15 - Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SDM
Faixa linear (µg mL ⁻¹)	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0
Sensibilidade (µau mL µg ⁻¹)	-0,021	- 0,043	-0,019	-0,063
Linearidade (r ²)	0.9990	0.9996	0.9994	0.9983
Precisão intra-ensaio (%RSD) n=5	2,84	5,24	4,31	3,01
Precisão inter-ensaio (%RSD) n=5				
25 ng g ⁻¹	12,99	11,11	12,65	10,81
50 ng g ⁻¹	5,81	8,64	7,14	6,02
100 ng g ⁻¹	3,41	4,88	3,49	3,57
LD (ng mL ⁻¹)	20	25	30	30
LQ (ng mL ⁻¹)	66	75	90	90

6.6.6.1 Precisão

Segundo o INMETRO [95] a precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Nesta pesquisa a precisão intra-ensaio foi avaliada mediante a análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, de duas amostras de mel fortificadas até a concentração de 100 ng g^{-1} . O RSD para todas as sulfonamidas ficou na faixa de 2,84 a 5,81% (Tabela 15). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de mel fortificadas em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}) em três dias diferentes, em quintuplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todas as sulfonamidas foi na faixa de 3,41 a 12,99% (Tabela 15).

Para a ANVISA [58] os intervalos de desvio padrão relativo (RSD) são considerados adequados se valores até 20% forem encontrados. Como todos os valores de RSD mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto pode ser considerado preciso.

6.6.6.2 Exatidão

A exatidão é medida com relação ao quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra [104], representado pelos valores das recuperações.

Foram realizados dois testes de recuperação, um utilizando apenas um nível de fortificação (100 ng g^{-1}) e um outro utilizando três níveis de fortificação (25, 50 e 100 ng g^{-1}). Para os testes de recuperação realizados em um mesmo dia, mesmo equipamento e mesmo analista, as recuperações variaram na faixa de 83 a 89,3%, estes resultados se encontram de acordo com os valores estipulados pela ANVISA [58], confirmando a exatidão do método.

As recuperações médias das sulfonamidas nos três níveis de fortificação avaliados de 74 a 88 %. Os menores valores de recuperação foram obtidos para o menor nível de fortificação, 25 ng g^{-1} , sendo de 72% e, proporcionalmente, a melhor recuperação foi encontrada para o maior nível de fortificação, 100 ng g^{-1} (88%). Dentre as quatro sulfonamidas estudadas, a sulfadiazina foi a que apresentou os melhores resultados em todos os níveis de fortificação (77, 86 e 88%, respectivamente).

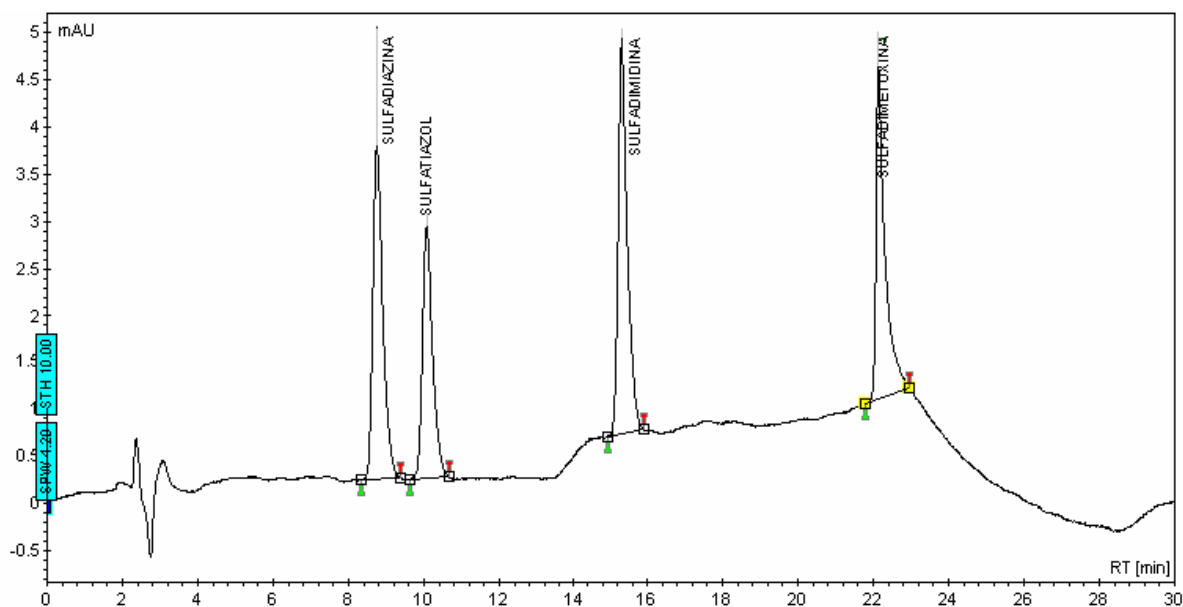


Figura 30 - Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹.

Os valores das recuperações das sulfonamidas obtidos nos três níveis ensaiados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.

Sulfa	Nível (ng g ⁻¹)	RM (%)	t _{calc}
SDZ	25	77	-1,05
	50	86	-1,40
	100	88	-2,00
STZ	25	72	-1,64
	50	81	-1,05
	100	82	-2,25
SDD	25	79	-1,05
	50	84	-1,14
	100	86	-2,33
SDM	25	74	-1,62
	50	82	-1,80
	100	84	-2,67

RM (%)= média das recuperações; t_{calc}= teste “t” de *Student* calculado

6.6.6.3 Avaliação estatística do método

Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student de significância. Na Tabela 16 são apresentados os resultados com as médias das recuperações percentuais relativas (RM%) obtidas para 5 (n-1) repetições e o t calculado para 95% do intervalo de confiança ($t_{95\%}$) do método aplicado.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados menores que o valor tabelado, $t_{tab}=2,78$, (Quadro 02 – ANEXO 2). Deste modo, aparentemente não existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), podendo-se considerar o método exato.

6.7 ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

O método proposto após ser desenvolvido e validado, foi utilizado para estimar a concentração das quatro sulfonamidas de interesse nesta pesquisa em amostras comerciais de mel provenientes do Estado do Maranhão e de estados vizinhos como o Piauí e Tocantins. Todas as amostras foram coletas no período de setembro de 2007 a março de 2008. Na Tabela 17 são apresentados o número de amostras, as cidades de coleta e suas respectivas codificações.

O objetivo destas análises foi aplicar o método desenvolvido, não realizando, portanto, um controle de qualidade mais completo nas amostras utilizadas, para o qual seriam necessárias mais amostras e aplicação de procedimentos de amostragem e coleta específicos para tal fim.

Tabela 17 – Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.

Estado	Cidade	Nº de amostras	Código
Maranhão	São Luís	01	MA1
	Santa Luzia do Paruá	01	MA2
Piauí	Teresina	01	PI
Tocantins	Paraíso	01	TO1
	Barrolândia	01	TO2

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da aplicação do método nas amostras de comerciais de mel.

Tabela 18 – Análise das amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.

Composto	Quantidade média (ng g ⁻¹) em amostras de mel, n=3				
	MA1	MA2	PI	TO1	TO2
SDZ	nd*	nd	nd	nd	nd
STZ	nd	nd	nd	nd	nd
SDD	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado, aplicando o LD de 20 ng g⁻¹ e LMR de 100 ng g⁻¹.

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os cromatogramas das amostras de méis de Santa Luzia do Paruá, São Luís, Tocantins e Piauí analisadas utilizando-se o método proposto.

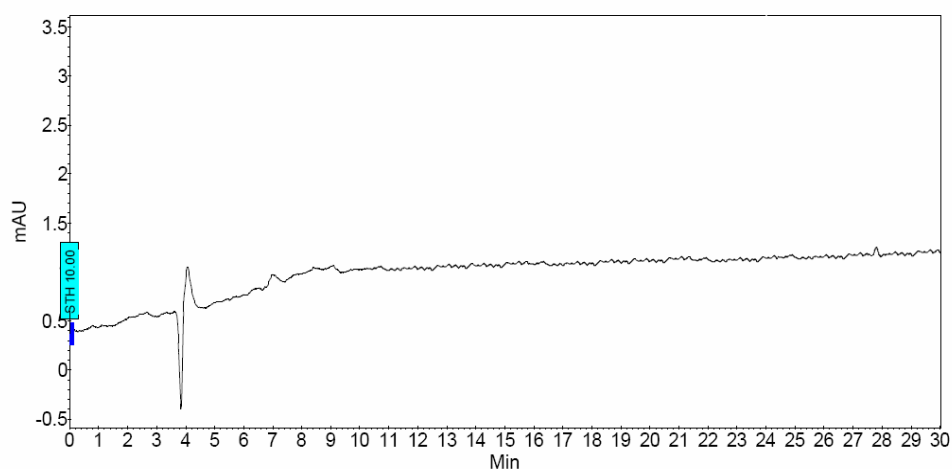


Figura 31 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá.

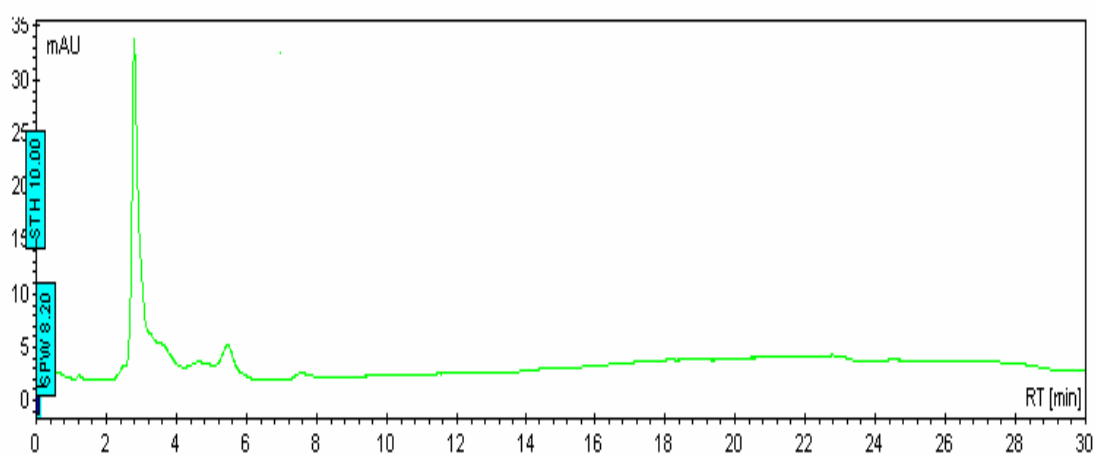


Figura 32 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.

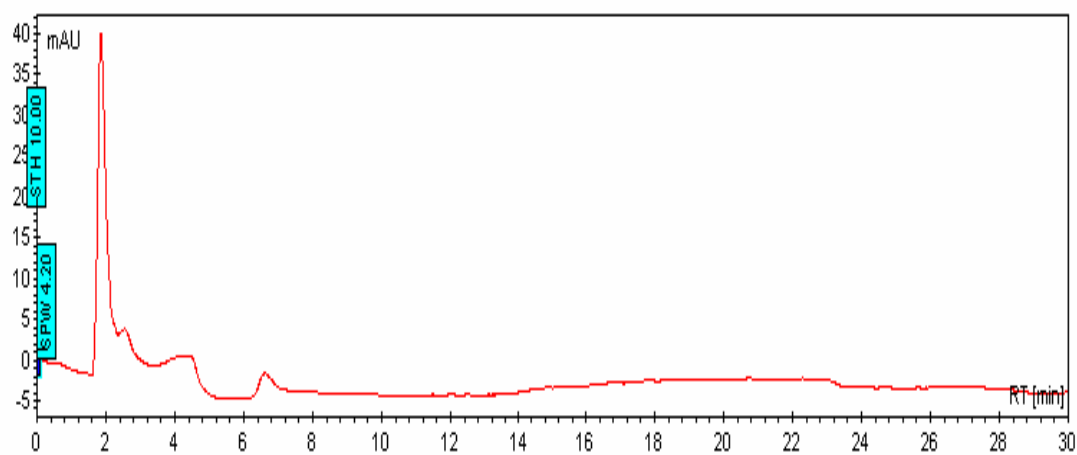


Figura 33 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins

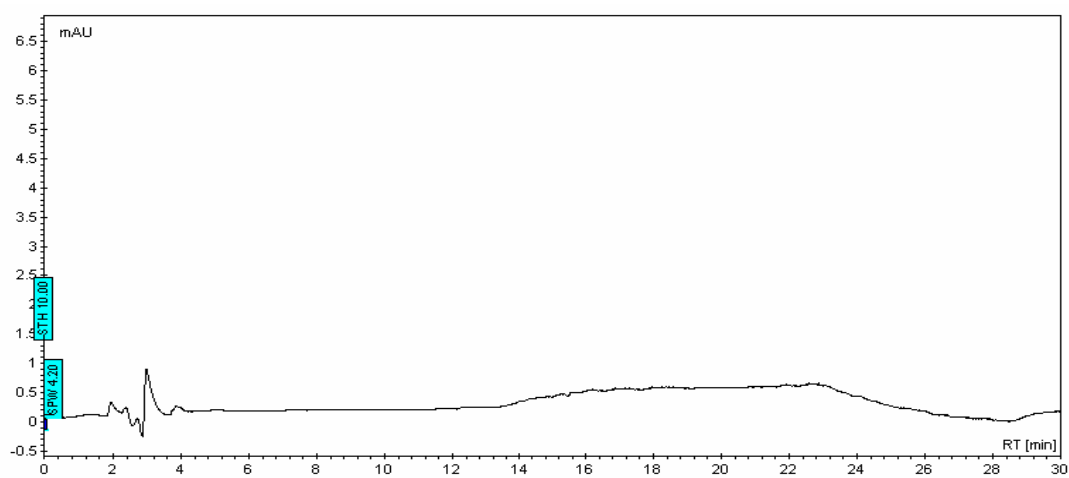


Figura 34 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí

Verifica-se pelas Figuras 31, 32, 33 e 34 que não há presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, indicando que as amostras estão livres de contaminação por resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina. Também não foram verificados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas nas outras amostras comerciais de mel estudadas.

7. CONCLUSÕES



7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel. O procedimento proposto foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato nas condições estabelecidas. Considerando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sulfonamidas ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), os limites de detecção e quantificação do CLAE-DAD apresentaram-se adequados para a análise de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel foi o preparo da amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realizou a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes.

A parte do trabalho relacionada aos estudos de pré-tratamento da amostra, ou seja, a etapa de hidrólise ácida mostrou-se eficiente para a redução do número de interferentes.

Os estudos de recuperação mostraram que para a extração de sulfonamidas em mel os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos Nexus. Foram realizados testes de recuperações em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}). As recuperações médias obtidas após otimização do método variaram de 72 a 88%, e os coeficientes de variação variaram de 2,84 a 12,99%.

Foi verificado que as amostras de mel coletadas e analisadas não apresentaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina, fato este que serve como indício da qualidade do mel produzido na Região Norte e Nordeste.

8. REFERÊNCIAS



8. REFERÊNCIAS

- [1] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000.
- [3] SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia – Relatório Completo**. Série Mercado. 2006.
- [4] PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. **Mel: Câmbio e Embargo Europeu podem prejudicar exportações em 2006**. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.4. abril/2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>> Acesso em: 19 de março de 2007.
- [5] SHIMANUKI, H. Bacteria. In: Flottum, K. (Ed.), **Honey Bee Pests, Predators, and Disease**, third ed. pp. 33–54, Medina, Ohio. 1997.
- [6] SCHWARTZ, D.P.; SHERMA, J.. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.72, 1986.
- [7] SHERMA, J.; BRETSCHNEIDER, W.; DITTAMO, M.; DIBIASE, N.; HUH, D.; SCWARTZ, J.P. **Journal of Chromatography**. v.463, p.229, 1989.
- [8] NEIDERT, E; BARANIAK, Z.; SAUVE, A. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.641, 1986.
- [9] SUN, H.; AI, L.; WANG, F. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. **Chromatographia**, v.66, N. 5/6, p.333-337, setembro, 2007.
- [10] FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M. de S.; SANTOS, J.G.R. dos; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTANA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.80-82, 2007.

- [11] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p.307-311, 2006.
- [12] GALLINA, A.; BENETTI, C.; BIANCOTTO, G.; BAGGIO, A.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; MUTINELLI, F. Antibiotics residues in honey: validation procedure. **APIACTA**, V.40, P.45-49, 2005.
- [13] ZAYAS-BLANCO, F. de; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatography separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, p.375-378, 2004.
- [14] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.
- [15] AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 3531-3539, 1990.
- [16] SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 875-879, 1990.
- [17] GARCÍA, J.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; ALDAMA, J.M. Validation of an analytical method to determine sulfamides in kidney by HPLC-DAD and PARAFAC 2 with first-order derivate chromatograms. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p. 222-234, 2007.
- [18] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European UNION REGULATION 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.23-29, 2004.
- [19] KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxyl/ N^4 -acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues and eggs. **Talanta**, v.67, p.54-58, 2005.

- [20] QUINTANA-RIZZO, J.; SALTER, R.S.; SAUL, S.J. Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin honey. **APIACTA**, V.40, P.55-62, 2005.
- [21] FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. **Chromatographia**, v.57, N. 5/6, p.317-320, 2003.
- [22] HAMMEL, Y.A; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.H.; GUY, P.A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p.58-76, 2008.
- [23] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.
- [24] MOHAMED, R.; HAMMEL, Y.-A.; LeBRETON, M.-H; TABET, J.-C.; JULLIEN, L.; GUY, P.A. Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1160, p.194-205, 2007.
- [25] LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.72, p.1082-1087, 2007.
- [26] KISHIDA, K. Quantitation and confirmatory of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, v.18, p.301-305, 2007.
- [27] BATT, A.L.; SNOW, D.D.; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, p.1963-1971, 2006.

- [28] PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, p.225-232, 2006.
- [29] KERR, W. E. **Papel das abelhas sociais na Amazônia**. Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente. (Florianópolis – SC - Brasil). 119-129. 1979.
- [30] SEBRAE, Apicultura brasileira – Produção Nacional. Disponível em : <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/IBGE.pdf> Acesso: 07 fev. 2008.
- [31] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2003 – 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1 Acesso em 23 ago, 2007.
- [32] SODRÉ, G. da S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA - APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [33] CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985, 226p.
- [34] NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [35] NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/storyhoney.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [36] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.
- [37] CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura - 01).
- [38] HOOPER, T. Guia do apicultor. [S.1]: Publicações Europ-América, p. 223-266, 1976.

- [39] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [40] SHIMANUKI, H., KNOX, D.A. Susceptibility of *Bacillus* larvae to Terramycin. **American Bee Journal**. 134, 125–126. 1994.
- [41] HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., KERSTERS, K., DEVOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N., AND BERKELEY, R. C. W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ahs *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.46, 270–279. 1996.
- [42] ALIPPI, A. M., ALBO, G. N., LENIZ, D., RIVERA, I., ZANELLI, M., AND ROCA, A. E. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control of American foulbrood in honey bees. **J. Apic. Res.** v.38, 149–158. 1999.
- [43] SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**. v.313, 1072–1077. 2006.
- [44] NESTLÉ. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS, Disponível em: www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?download=M3wBPgDB/8ull6Du36WenojQ1NTTjaXZnqWfVpzLhmf> Acesso em: 05 jul. 2007.
- [45] PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- [46] GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.

- [47] FELI, M.A.F. Antibacterianos – Sulfonamidas. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/sulfonamidas2007.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- [48] MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.
- [49] WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 23, n. 4, p.362-384, abril, 2006.
- [50] MERCK, The Merck Index—**An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, Merck, Rahway, NJ, 1989.
- [51] WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.40, ISSUE 7, p. 723-730, abril, 2000.
- [52] MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Campinas-SP, 2007. 197p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. III - Universidade Estadual de Campinas.
- [53] QIANG, Z.; ADAMS, C. Potenciometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**. v.38, ISSUE 7, p.723-730, abril, 2000.
- [54] COMBS, M.T.; KHORASSANI, M.A.; TAYLOR, L.T. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight sulfonamides. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p.301-308, 1999.
- [55] O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 297-319, 1998.

[56] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[57] BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999. Disponível em: <

www.dgv.min-agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório%202006%20divulgação.pdf

> Acesso em: 22 de março de 2007.

[58] ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.

[59] DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. **In: Antimicrobials in foods**. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.

[60] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLMÍ, C.; CURINI, R. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4614-4624, 2004.

[61] MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid-chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85-92, 2004.

[62] MARTEL, A.-C.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, N. 6, p.953-961, 2003.

[63] 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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p.534-541, 2003.

[64] HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, N. 5, p.786-789, 1992.

- [65] WANG, Z.; ZHANG, S.; DING, S.; EREMIN, S.A.; SHEN, J. Simultaneous determination of sulphamethazine and sulphadiazine in a new monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay. **Food Additives e Contaminants**. v.25, p.574-582, maio, 2008.
- [66] TAMOSUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. Comparison of LC and UPLC Coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. **Chromatographia**. v.67, p. 783-788, set, 2008.
- [67] GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A M.M.; RABONE, F.; SALERMO, A.G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 116-119, jan, 2008.
- [68] ZOU, Q.-H; WANG, J.; WANG, X.-F; LIU, Y.; HAN, J.; hou, f.; xie, m.-x. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal AOAC International**, v.91, p.252-257, jan, 2008.
- [69] BISWAS, A.K.; RAO, G.S.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MALIK, J.K. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8845-8850, 2007.
- [70] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.
- [71] LAMBA, S.; SANGHI, S.K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.110-115, 2005.
- [72] PANG, G.-F.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; JIA, G.-Q; FAN, C.-L.; LI, X.-M.; LIU, Y.-M.; LI, Z.-Y.; SHI, Y.-Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.88, p.1304-1311, maio, 2005.

- [73] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p.259-264, 2005.
- [74] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSA, J.; SNIEGOCKI, T.; GRZEBALSKA, A. Sulfonamides residues in honey. Control and Development of Analytical Procedure. **APIACTA**, v. 38, p.249-256, 2003.
- [75] REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**, V.38, P.23-30, 2003.
- [76] POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p.111-117, 2002.
- [77] HELLER, D.N.; NGOH, M.A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M.H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.39-52, 2002.
- [78] STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamides residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p.37-42, 2000.
- [79] ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.95-102, 2000.
- [80] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.

- [81] HEERING, W.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAVER, E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v.123, p.2759-2762, 1998.
- [82] GEHRING, T.A; RUSHING, L.G.; CHURCHWELL, M.I.; DOERGE, D.R.; McERLANE, K.M.; THOMPSON JR, H.C. Determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 44, N. 10, 3164-3169, 1996.
- [83] 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, p.1457-1461, outubro, 1996.
- [84] VIÑAZ, P.; ERROZ, C.L.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescent derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.726, 1995.
- [85] PATHY, M. Trace analysis of sulfaquinoxaline in animal tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Vol. 275, 115-125, 1983.
- [86] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation technique for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.36-53, 2007.
- [87] LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, p.1-35, 2004.
- [88] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.68-76, 2001.
- [89] ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos – SP. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2006.

- [90] TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean up procedures and selective detectors. **Journal Chromatography A**, v.823, p.137-146, 1996.
- [91] QUEIROZ, S. C. N.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- [92] MAJORS, R. E. **LC-CG Supplement**. v.8, *maio*, 1998.
- [93] IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba – PR. p.134. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [94] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. **Química Nova**, v.27, n.5, set./out., 2004.
- [95] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ – CGCRE – 008**, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> Acesso em: 24 maio 2007.
- [96] BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.
- [97] RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. Campinas-SP, 96p. Dissertação (mestrado) - Unicamp, 2004.
- [98] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.
- [99] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. London, 1995. Q2A

(CPMP/ICH/381/95). Disponível em: www.eudra.org/emea.html. Acesso em 11 de fev. 2008.

[100] THOMPSON, M.; ELISSON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure App. Chem.**, v.74, p.835-855, 2002.

[101] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals**. Expert Consultation, 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 11 fev. 2008.

[102] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

[103] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

[104] LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76p.

[105] HUBERT, P. et al The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

[106] USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776- 1777, 1995.

[107] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em 26 de out. 2007.

[108] BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

[109] EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods**. Brussels: EUROPEAN COMMISSION, 2004. SANCO/825/00. rev.7. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf>.

Acesso em: 11 fev. 2008.

[110] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora, 2001.

[111] IBGE, Cidades - Prefeituras e Municípios 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>> Acesso em: 23 maio 2008.

[112] GOOGLE EARTH. Disponível em: <www.google.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

[113] SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

[114] SHETH, H.B.; YAYLAYAN, V.A.; LOW, N.H.; STILES, M.E.; SPORNS, P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1125-1130, 1990.

[115] SCHWAIGER, I.; SCHUCH, R. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.** v. 96, p.93, 2000.

[116] CANCHO-GRANDE, B.; FALCÓN, M.S.G.; COMESAÑA, M.R.; GÁNDARA, J.S. Determination of sulfametazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3145-3150, jun. 2001.

[117] INMETRO - INSTITUTO DE QUALIDADE E METROLOGIA. **Expressão da Incerteza de medição**, Rio de Janeiro, Apostila, 2002.

[118] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidande: validation of chromatographic methods**. Rockville: Center for Drug Evaluation

and Research (CDER), 1994. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf. Acesso em 11 de fev. 2008.

[119] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedural Manual**. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

[120] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; SANTOS, T.C.R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p.155-168, 2002.

[121] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, jul./dez., 1994.

[122] DE AMARANTE Jr; O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, São Luís, v.12, n.1/2, p.116-131, 2001.

[123] LEITE, F. In: **Validação em Análise Química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 4^a ed., 2002.

[124] CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.10.

[125] COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp. Campinas, 170 p., 1998.

[126] MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; DIEZ, M.M.; GARCÍA, M.C.M.; GIL, D.B.; CAÑADA-CAÑADA, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in Money simples. **Talanta**, v.73, p.304-313, 2007.

[127] THOMPSON, T.S.; PERNAL, S.F.; NOOT, D.K.; MELATHOPOULOS, A.P.; VAN DEN HEEVER, J.P. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.304-311, 2007.

- [128] LI, H.; KIJAK, P.J.; TURNIPSEED, S.B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: a multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.836, p.22-38, 2006.
- [129] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p.174-181, 2005.
- [130] THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p.168-176, 2005.
- [131] STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A Multiresidue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. **Analytica Chimica Acta**, v.547, p.262-268, 2005.
- [132] SOTO-CHINCHILA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCIA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)]oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p.60-67, 2005.
- [133] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y.-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8468-8473, setembro, 2005.
- [134] MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.64, p.87-100, 2004.

- [135] CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDERIS, B.M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta**, v.494, p.21-28, 2003.
- [136] FUH, M.R.; CHU, S.Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p.215-221, 2003.
- [137] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separations conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v. 98, p.153-158, 2003.
- [138] CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and eggs. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, N. 3, p.558-566, 2003.
- [139] REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.225-232, 2003.
- [140] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.153-158, 2003.
- [141] RHIJI, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A.; BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.121-133, 2002.
- [142] VERZEGNASSI, L.; SAVOY-PERROUD, M.-C.; STANDLE, R.H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.77-87, 2002.

- [143] FUH, M.-R.S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, p.1127-1139, 2001.
- [144] LINDSEY, M.E.; MEYER, M.; THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.73, N. 19, p.4640-4646, outubro, 2001.
- [145] NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C.; BERNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p.169-177, 2000.
- [146] DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p.1243-1247, 2000.
- [147] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [148] REEVES, V.B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.723, p.127-137, 1999.
- [149] KENNEDY, D.G.; McCRAKEN, R.J.; CANNAVAN, A.; HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p.77-98, 1998.
- [150] CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M.E.; DIMARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal of Chromatography B**, v. 706, p.269-277, 1998.

- [151] AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.1-40, 1995.
- [152] KRISTLANSEN, G.K.; BROCK, R. Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. **Analytical Chemistry**, v.66, N. 19, p.3253-3258, outubro, 1994.
- [153] NIESSEN, W.M.A.; USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. **Analyst**, v.119, p.2543-2548, dezembro, 1994.
- [154] PORTER, S. Confirmation of sulfonamides residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, v.119, p.2753-2756, 1994.
- [155] SHETH, H.B.; SPORNS, P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.1696-1700, 1991.
- [156] UMAGAT, H.; McGARRY, P.F.; TSCHERNE, R.J. Stability indicating sulfa drug analysis using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, N. 7, p.922-924, 1979.

9. ANEXOS



9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Quadro 01 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel – PNCR/2007.

Grupo	Analito	Matriz	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR/NA* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	Mel	CLAE/UV	25	200	7
	Oxitetraciclina (a)					
	Tetraciclina (a)					
	Sulfatiazol (b)	Mel	CLAE/UV	25	100	15
	Sulfadimetoxina (b)					
	Sulfadiazina					
	Sulfaquinoxalina					
	Sulclorpiridazina	Mel	CL/EM-EM	0,5	1(I)*	30
	Nitrofurazona – SEM					
	Furazolidona – AOZ					
	Furaltadona – AMOZ					
	Nitrofurantoina - AHD					
	Tilosina	Mel	CL/EM-EM	0,5	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	Mel	CG/EM-EM	10	10	15
	Alfa-endosulfan			10	10	
	4,4-DDE			10	10	
	4,4-DDD			10	10	
	4,4 DDT			10	10	
	Dodecacloro			10	10	
	Endrin			10	10	
	Iprodiona			50	50	
	Tetradifona			20	20	
	Captana			50	50	
	Lindane			10	10	

Fonte: BRASIL [57].

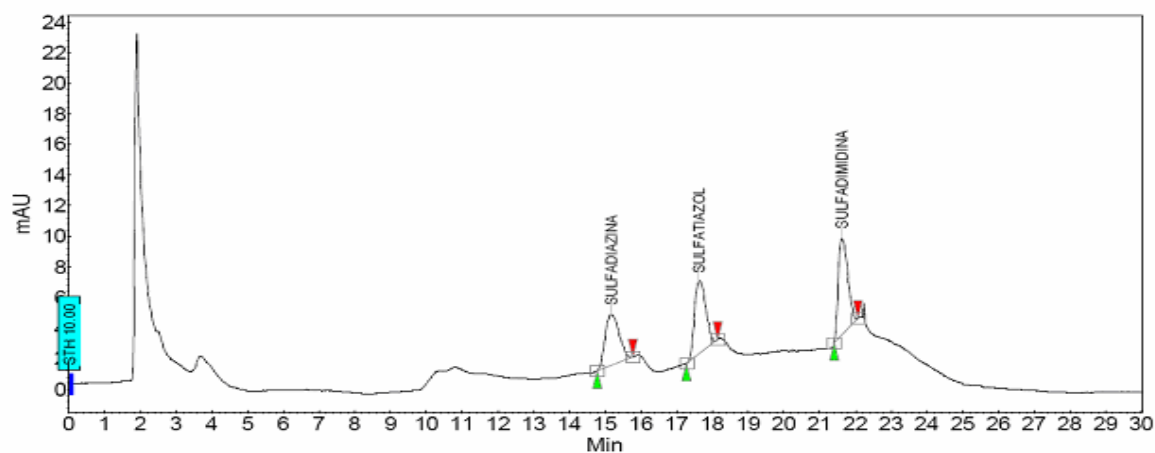
9.2 ANEXO 2

Quadro 02 – Distribuição dos valores do teste “*t*” de Student

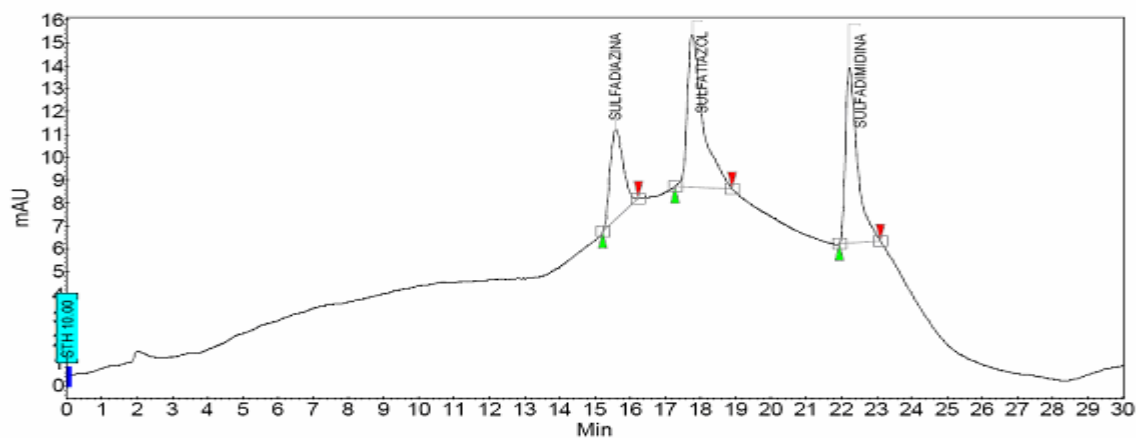
GL (n)	t _{95%}
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086

Fonte: Instituto de Qualidade e Metrologia [2002].

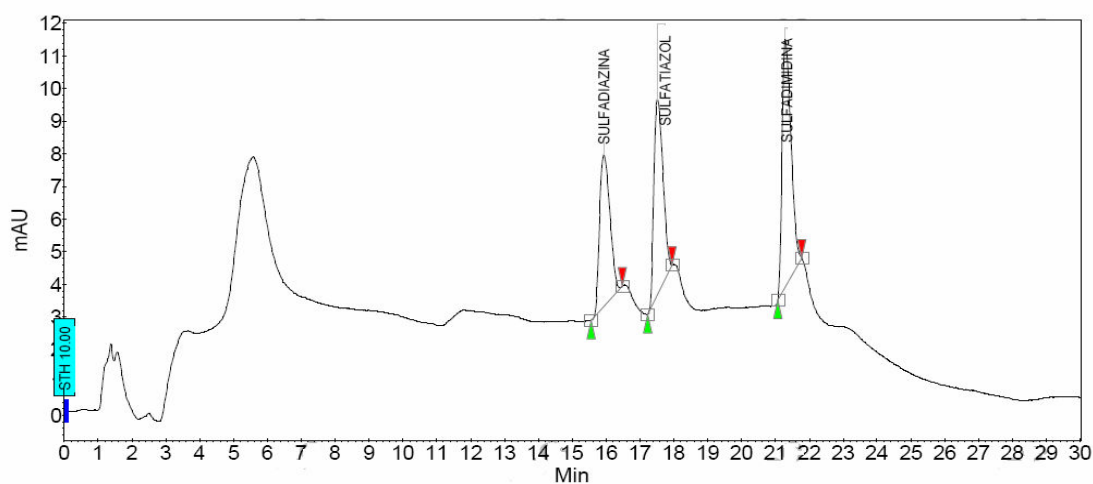
9.3 CROMATOGRAMAS DOS TESTES DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL



(a)

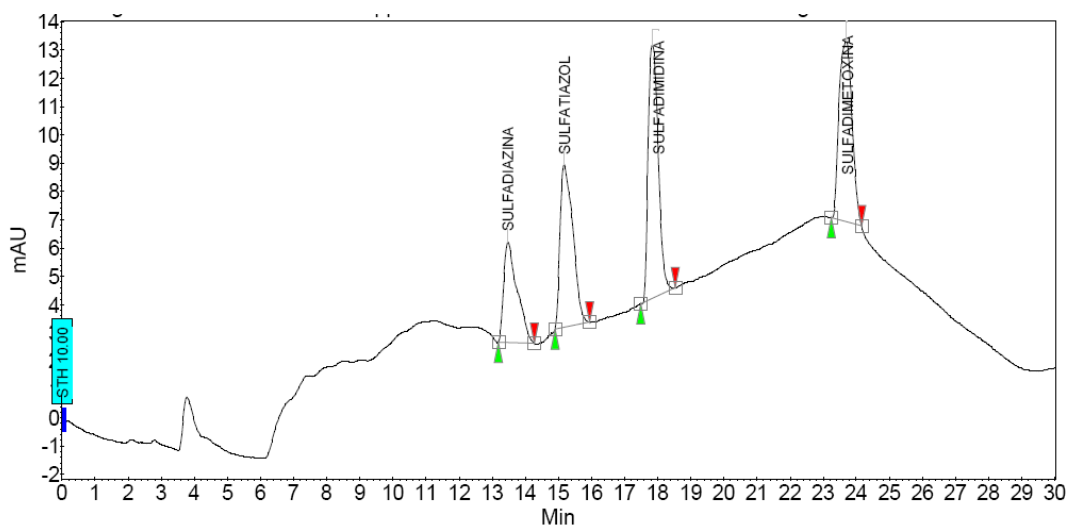


(b)

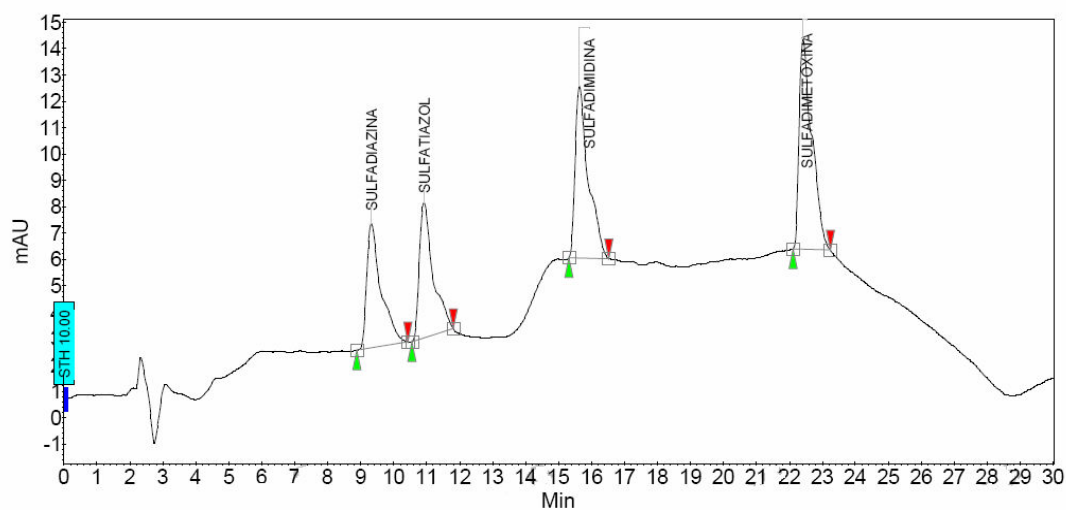


(c)

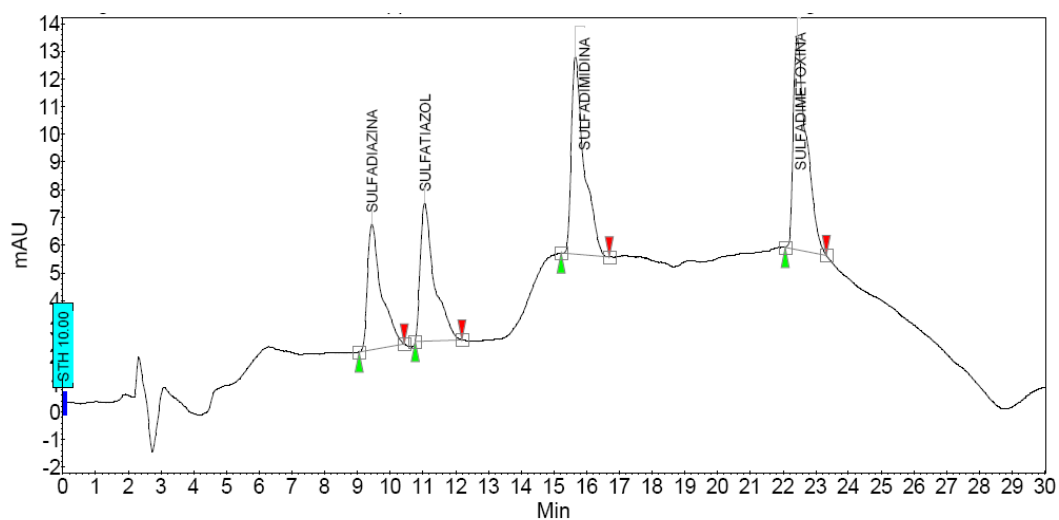
Figura 35 -Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5/Metanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 36 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

São Luís
2008

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco

São Luís
2008

Silva, Verônica Alves Gonçalves da

Desenvolvimento de metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos/ Verônica Alves Gonçalves da Silva. São Luís, 2008.

130f.

Orientador: Teresa Cristina R. dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Química. São Luís, 2008.

1. Mel – resíduos de sulfonamidas. 2. Produção de mel. 3. Extração em fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina R. dos Santos, orient. II. Título.

CDU 658.56:638.14.06

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^ª. Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco
(Orientadora)**

**Prof^º Dr. Laerte da Cunha Azeredo
(DEQUI/UFRRJ)**

**Prof^º Dr. Fernando Carvalho
(DETEQUI/UFMA)**

A Deus e a Nossa Senhora...

Aos meus pais: Maria da Penha Alves da Silva
e Êulete Gonçalves da Silva.

Ao meu amor, Fábio Silveira Vidal.

À minha sobrinha: Iracema D'monik Miranda
Gonçalves da Silva.

E ao meu irmão Fabrício C. G. da Silva.

Por todo amor, carinho e paciência.

E pelo incansável incentivo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos memoráveis, coisas inexplicáveis e pessoas inesquecíveis”.

Ao nosso Deus, Todo Poderoso, meu Mestre, meu Pastor, meu Senhor, por ter me dado coragem para superar todas as dificuldades, por nunca me desamparar!... A Nossa Senhora, que tanto me inspira, em todos os momentos, tirando-me de todas as dificuldades e levando-me a serenidade.

Aos meus pais, que me fornecem a força necessária para tudo na minha vida, por terem me educado tão bem, ensinando-me valores essenciais para ser uma boa pessoa e uma profissional consciente e de muita ética. Agradeço ao meu pai pelo exemplo de pessoa culta e a minha mãe pelo exemplo de professora dedicada. Agradeço também à valiosa lição de sempre me mostrarem que sozinhos não somos nada, mas somos muito mais com a ajuda dos amigos.

Aos meus tios, tia Cida e tio Laerte, por desde cedo me ensinarem a amar a química e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada também por me ensinarem a superar obstáculos estudando.

Ao meu noivo Fábio Silveira Vidal, que tão pacientemente ouviu todas as minhas dúvidas, afagou minhas tristezas, pelo carinho, pelo companheirismo, pelas horas que passou comigo estudando química e pelo seu generoso amor que tanto me incentivou em todas as atividades sempre acreditando que eu iria conseguir.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, por me acolher tão carinhosamente, por seu incentivo durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório NARP pela convivência.

Ao amigo, José Crediciomar pelo apoio, incentivo, paciência (para me ensinar a utilizar o equipamento (HPLC)) e pela grande demonstração de amizade.

Aos meus amigos: Gilvan, Raphael e Álvaro, amigos que fiz e aonde quer que eu vá levarei em meu coração. Agradeço a cumplicidade e agradável convívio, as conversas e os bons momentos compartilhados. Raphael te agradeço mais ainda pela grande ajuda na finalização desta pesquisa, muito obrigada meu amigo!

A querida amiga e bibliotecária, Rosivalda Pereira, pela acolhida fantástica, pelas adoráveis e produtivas conversas na biblioteca do CCET e pela grande ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

A amiga Cláudia Guerra pela convivência, pelo carinho, amizade e por ser minha família em São Luís.

Ao Profº José Wilson pela amizade e orientação profissional, desde a disciplina de catálise continuando seus ensinamentos por todo o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química: Marise e Daniele, aos funcionários do Departamento de Tecnologia Química: Alba, Ivaldo e de outros setores da UFMA, em especial a Dona Eunice e Senhor Alberto, pela constante disposição em me ajudar na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“A pesquisa científica consiste em
ver o que todo mundo já viu, mas
pensar em algo que ninguém pensou
ainda”.*

(Albert Szent-Györgyi)

RESUMO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável, não sendo permitido a presença de aditivos e/ou agentes conservadores. Na apicultura as sulfonamidas são muito utilizadas na prevenção e controle de doenças em colméias, como a cria pútrida americana causada pelo *Paenibacillus larvae*. Uma consequência desta prática é a presença destes resíduos no mel, o que pode causar reações alérgicas nos consumidores. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas no mel. No Brasil, a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A realização de programas de monitoramentos de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando possíveis danos à saúde do consumidor. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico multiresidual para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel de abelhas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A metodologia estabelecida consistiu nas seguintes condições: extração em fase sólida com sorvente Nexus, eluição com 5 mL de acetonitrila e reconstituição com solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, com adição de 1% de metanol, separação em coluna analítica C18, fase móvel acetonitrila e água, no modo de eluição em gradiente e detecção a 278 nm. O preparo de amostra consistiu na hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} de uma alíquota de mel e ajuste para pH 4,5 com solução tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. O método foi validado e os resultados demonstraram exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Foi encontrada boa faixa de linearidade, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 41 a 89% e estimativa do desvio padrão relativo variando entre 2,36 e 14% para os quatro compostos estudados. Os limites de detecção das quatro sulfas em amostra de mel variaram de 20 a $30 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 60 a $90 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para as concentrações totais de SDZ, STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite adequada determinação das quatro sulfas em amostras de mel de abelhas.

Palavras-chave: Sulfonamidas. CLAE-DAD. Extração por fase sólida. Validação. Mel.

ABSTRACT

Honey is a natural substance produced by bees and by your nature it is considered a healthy product. Presence of additives and/or preserve agents is not permitted. On apiculture, sulfonamides are largely used on prevention and control of beehive disease, such as American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. A consequence of this practice is the presence of these residues in honey, that should cause allergy reactions on consumers. In the last years, some published works is discussing the presence of antibiotic and sulfonamides residues in honey. In Brazil, the presence of antibiotics residues in food is controlled by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and by the Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). The realization of monitoring contaminants residues in food programs, as well as the Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) from MAPA are essentials to the sanitary vigilance actions development, preventing and controlling possible hazard to the consumer health. This work has the objective the development and validation of multiresidue analytical method to the sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidine and sulfadimethoxine determination in bee honey using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). The established methodology consisted on such conditions: solid phase extraction with Nexus sorbent, elution with acetonitrile 5 mL, and reconstitution with sodium acetate buffer (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5, with 1% methanol addition, separation on analytical column C18, acetonitrile and water mobile phase, on gradient elution mode and detection on 278 nm. The sample preparation consisted on the acid hydrolysis with hydrochloric acid 2 mol L⁻¹ of a honey rate and adjust to pH 4,5 with sodium acetate buffer solution 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5. The method was validated and the results demonstrated accuracy and precision between the limits established by the current legislation. Good linearity range was encountered, obtaining recovery values varying from 41 to 89% and relative standard deviation estimative varying between 2,36 and 14% to the four studied compounds. The four sulfonamides detection limits in honey sample varying from 20 to 30 µg kg⁻¹ and the quantification limits varied from 60 to 90 µg kg⁻¹. Considering 100 µg kg⁻¹ the residue maximum limit established by the Brazilian legislation to the SDZ, STZ, SMZ and SDM total concentration, the described method permit suitable determination of the four sulfonamides in bee honey.

Keywords: Sulfonamides. HPLC-DAD. Solid phase extraction. Validation. Honey.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 2	Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.....	45
Quadro 3	Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.....	49
Quadro 4	Testes para seleção da composição da fase móvel.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição típica do mel.....	24
Tabela 2-	Propriedades gerais das sulfonamidas.....	27
Tabela 3-	Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.....	38
Tabela 4-	Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.....	64
Tabela 5-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	67
Tabela 6-	Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.....	74
Tabela 7-	Estudo da composição da fase móvel.....	80
Tabela 8-	Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.....	83
Tabela 9-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	87
Tabela 10-	Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)....	90
Tabela 11-	Resultados dos testes de eficiência de extração.....	91
Tabela 12-	Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.....	93
Tabela 13-	Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 14-	Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão.....	97
Tabela 15-	Parâmetros de validação para o método desenvolvido.....	98
Tabela 16-	Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.....	100
Tabela 17-	Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.....	102
Tabela 18-	Análise de amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de mel no Brasil.....	23
Figura 2	Diferentes tipos de mel.....	24
Figura 3	Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas: (a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.....	26
Figura 4	Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida)...	27
Figura 5	Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.....	28
Figura 6	(a) Esquema de cartucho para EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.....	44
Figura 7	Principais etapas empregadas EFS.....	45
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.....	50
Figura 9	Processo de fortificação das amostras.....	54
Figura 10	Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.....	59
Figura 11	(a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.....	60
Figura 12	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.....	63
Figura 13	Procedimentos experimentais empregados nas etapas de extração EFS.....	69
Figura 14	Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.....	72
Figura 15	Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.....	75
Figura 16	Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatógrafo: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm.....	76
Figura 17	Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, 1,0 mg L ⁻¹ , usando C ₁₈ (cromatograma vermelho), C ₈ (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).....	77
Figura 18	Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto).....	78
Figura 19	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água.....	81

Figura 20	Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,5.....	82
Figura 21	Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L ⁻¹	84
Figura 22	Estudo da degradação das soluções-padrão.....	84
Figura 23	Esquema da reação açúcar-sulfonamida.....	86
Figura 24	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , sem hidrólise ácida.	88
Figura 25	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , com hidrólise ácida.	89
Figura 26	Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de <i>clean-up</i>	92
Figura 27	Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹	93
Figura 28	Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.....	95
Figura 29	Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).....	96
Figura 30	Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de 100 ng g ⁻¹	100
Figura 31	Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá	102
Figura 32	Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.....	103
Figura 33	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins.....	103
Figura 34	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí.....	103
Figura 35	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L ⁻¹) pH 4,5/Metanol.....	129
Figura 36	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
C8	Fase estacionária do tipo octilsilano
CODEX	<i>Codex Alimentarius</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido com detector por arranjo de fotodiodos
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
CL	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida - EFS)
t _R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Detector por absorbância no ultravioleta-visível

LISTA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
STZ	Sulfatiazol
SAD	Sulfanilamide
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SID	Sulfisomidina
SMTX	Sulfametoxazol
SDM	Sulfadimetoxina
SBM	Sulfabenzamida
SDX	Sulfadoxina
SQX	Sulfaquinoxalina
SME	Sulfameter
SMX	Sulfamoxol
SMP	Sulfametoxipiridazina
SCP	Sulfacloropiridazina
SSZ	Sulfasalazina
SMDZ	Sulfametoxidiazina
SMTT	Sulfametiltiazol
SMM	Sulfamonometoxina
SAI	Sulfisoxazol
SCT	Sulfacetamida
SGN	Sulfaguanidina
SMT	Sulfametizol
STR	Estreptomicina
DHS	Diidroestreptomicina
CAP	Cloranfenicol
OTC	Oxitetraciclina
AMP	Ampicilina
TC	Tetraciclina
DMC	Democlociclina
CTC	Clorotetraciclina
NEO	Neomicina
PENG	Penicilina G
SPI	Espiramicina
DC	Doxiciclina
PEN	Penetamato
DES	Desmicosina
OLE	Oleandomicina
TIL	Tilmicosina
TYL	Tilosina
OXA	Oxacilina
EA	Eritromicina
CLOX	Cloxacilina
NAF	Naficilina
DIC	Dicloxacilina
ROXI	Roxitromicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µ	Micron
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	Minuto
sec	Segundo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
R ²	Coefficiente de Determinação ou de Correlação Múltipla ou Eficiência da Regressão
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Amostral
t	t de <i>Student</i>
$\bar{X}$	Média aritmética
x _i	Valor Medido
Σ	Somatório
√	Raiz quadrada
σ	Desvio padrão da população

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	22
1.1.1	Características físico-químicas do mel.....	23
1.1.2	Doenças nas abelhas e na colméia.....	25
1.2	SULFONAMIDAS.....	26
1.2.1	Resíduos de sulfonamidas no mel.....	29
1.2.2	Aspectos da legislação.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS.....	35
3.1	PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	43
3.1.1	Extração por Fase Sólida (EFS).....	43
4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.1	FAIXA DE APLICAÇÃO.....	49
4.2	LINEARIDADE.....	51
4.3	SELETIVIDADE.....	51
4.4	PRECISÃO.....	52
4.4.1	Repetitividade.....	52
4.4.2	Precisão intermediária.....	53
4.4.3	Reprodutibilidade.....	53
4.5	EXATIDÃO.....	53
4.5.1	Recuperação.....	54
4.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	55
4.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	56
5.	MATERIAIS E MÉTODO.....	58
5.1	METODOLOGIA.....	58
5.1.1	Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas.....	58
5.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	60

5.2.1	Padrões.....	60
5.2.2	Reagentes e Solventes.....	60
5.2.3	Dispositivos para Extração por Fase Sólida.....	60
5.2.4	Coluna Cromatográfica.....	61
5.2.5	Equipamentos.....	61
5.2.6	Outros materiais.....	62
5.3	MÉTODO.....	62
5.3.1	Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas.....	63
5.3.1.1	Seleção da coluna.....	64
5.3.1.2	Linha de Base do Solvente.....	64
5.3.1.3	Conformidade do Sistema.....	64
5.3.1.4	Seleção do Comprimento de onda.....	65
5.3.1.5	Seleção da fase móvel.....	65
5.3.1.6	Preparação dos padrões.....	65
5.3.2	Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração.....	66
5.3.2.1	Pré-tratamento da amostra.....	66
5.3.2.2	Seleção do adsorvente.....	67
5.3.2.3	Condicionamento dos cartuchos.....	67
5.3.2.4	Eluição dos analitos.....	68
5.3.2.5	Extração por EFS.....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	69
5.4.1	Seletividade.....	70
5.4.2	Linearidade.....	70
5.4.3	Limites de Detecção e de Quantificação.....	70
5.4.4	Estudo de recuperação.....	71
5.4.4.1	Precisão.....	71
5.4.4.2	Exatidão.....	71
5.5	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1	SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	74
6.2	SELEÇÃO DA COLUNA.....	77
6.3	SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	77
6.3.1	Seleção do pH da fase móvel.....	78

6.3.2	Composição da fase móvel.....	79
6.3.3	Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho.....	82
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	83
6.5	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS.....	85
6.5.1	Pré-tratamento da amostra.....	85
6.5.2	Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração em fase sólida.....	90
6.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	94
6.6.1	Conformidade do sistema.....	94
6.6.2	Seletividade.....	95
6.6.3	Curva analítica.....	96
6.6.4	Faixa linear, linearidade, sensibilidade.....	97
6.6.5	Limites de detecção e quantificação.....	97
6.6.6	Precisão e Exatidão.....	98
6.6.6.1	Precisão.....	98
6.6.6.2	Exatidão.....	99
6.6.6.3	Avaliação estatística do método.....	101
6.7	ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	101
7.	CONCLUSÃO.....	106
8.	REFERÊNCIAS.....	108
9.	ANEXOS.....	127
9.1	ANEXO 1.....	127
9.2	ANEXO 2.....	128
9.3	ANEXO 3.....	129

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável. A adição de aditivos e agentes conservadores no mel não é permitida. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas em mel. Antibióticos são principalmente usados na apicultura para o tratamento de doenças bacterianas ou outros tipos de doenças infecciosas [1].

Para aceitação do produto apícola, no Brasil, é necessário que o produto obedeça ao regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A legislação vigente é descrita na Instrução Normativa N. 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [2]. A citada norma define tipos de mel, procedimento de obtenção, apresentação e/ou processamento, além de estabelecer limites para os dez principais parâmetros físico-químicos, importantes na avaliação da pureza, maturidade e possível adulteração do mel.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro no mercado externo, é necessário que o produto cumpra as exigências estabelecidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), mais especificamente do Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM [3]. O programa visa atender às exigências do mercado externo, em especial da Comunidade Européia, responsável por mais de 90% da exportação de mel brasileiro e estabelece, dentre outras coisas, a avaliação quanto à presença de resíduos no produto, o potencial da utilização inadequada de drogas no produto e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas. Várias classes de substâncias tóxicas são incluídas neste programa, mais especificamente organoclorados, antibióticos, metais pesados, substâncias promotoras de crescimento, tireostáticos e sulfonamidas.

A ausência de controle de resíduos no mel brasileiro foi a principal justificativa para o embargo ocorrido em 2006 na União Européia [4]. Uma das grandes preocupações do mercado apícola atual é a eliminação total de resíduos de antibióticos e defensivos agrícolas no mel. Utilizados para prevenir e tratar enfermidades nas abelhas e doenças de origem bacteriana na colméia fora da época de florada, os antibióticos, se utilizados sem o devido controle, podem causar prejuízos a qualidade do mel. A restrição do comércio internacional baseia-se no fato de que tais substâncias poderiam atingir o consumidor, que estaria ingerindo o mel contaminado, acarretando danos à sua saúde, tais como, adaptação e resistência de

bactérias no organismo. Por este motivo é que, recentemente, alguns países compradores de mel têm incluído em suas exigências um produto apícola livre de antibióticos.

Embora o uso de antibióticos em colméias seja uma prática constante dos apicultores, o Brasil possui um grande diferencial no contexto mundial, visto que existem poucos registros de doenças comuns em abelhas, principalmente na região Nordeste.

Sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, na apicultura, são utilizadas no tratamento e prevenção da “cria pútrida” em abelhas, doença provocada pelo *Paenobacillus larvae*. Uma consequência direta do uso é a ocorrência de resíduos de sulfonamidas no mel de abelhas, o que compromete a qualidade do produto [5].

Estudos para estes compostos incluem procedimentos colorimétricos como a reação de Bratton-Marshall [6;7]; cromatografia em camada delgada (CCD) [8], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) [9, 10; 11; 12; 13; 14; 15 e 16, dentre outros], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) [17; 18; 19; 20 e 21, dentre outros] espectrometria de massas no modo “tandem” (CLAE-EM ou CLAE-EM/EM) [22; 23; 24; 25; 26; 27 e 28, dentre outros].

A literatura atualmente disponível para análise de sulfonamidas em mel ressalta a especificidade da matriz com relação à aplicação de métodos analíticos. No Brasil, existem poucos trabalhos com sulfonamidas em mel. A disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos apícolas, quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, é essencial para fornecer aos apicultores garantias sobre a qualidade de seu produto, garantindo-lhes condições de exportar. Pelo exposto é que veio o interesse em fazer esta pesquisa. Este trabalho também poderá ser utilizado como um incentivo na realização de novos estudos envolvendo sulfonamidas em alimentos (matrizes diferentes de mel).

1.1 MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS

O Brasil tem um grande potencial apícola, devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variedade edafoclimática existente, o que possibilita produzir mel o ano todo [29]. A apicultura é uma atividade que se enquadra no tripé da sustentabilidade podendo favorecer programas de desenvolvimento econômico, social e ecológico como os existentes no Nordeste brasileiro. Em 2004 o Brasil alcançou a posição

de 11º produtor mundial de mel (40 mil toneladas) e o 5º exportador mundial (21 mil toneladas). No cenário mundial, os principais produtores de mel são China, Estados Unidos e Argentina e os maiores exportadores são China, Argentina, México e Alemanha. No Mercosul, o Brasil é superado apenas pela Argentina. A produtividade brasileira ainda é baixa [3].

Dos produtos apícolas o mel é o que tem maior destaque para o comércio. A região Sul é a principal região produtora de mel no país com 47,72%. A região Nordeste vem na segunda posição com 31,58% da produção, seguida das regiões Sudeste (16,22%), Centro-Oeste (2,87%) e Norte (1,62%) [3].

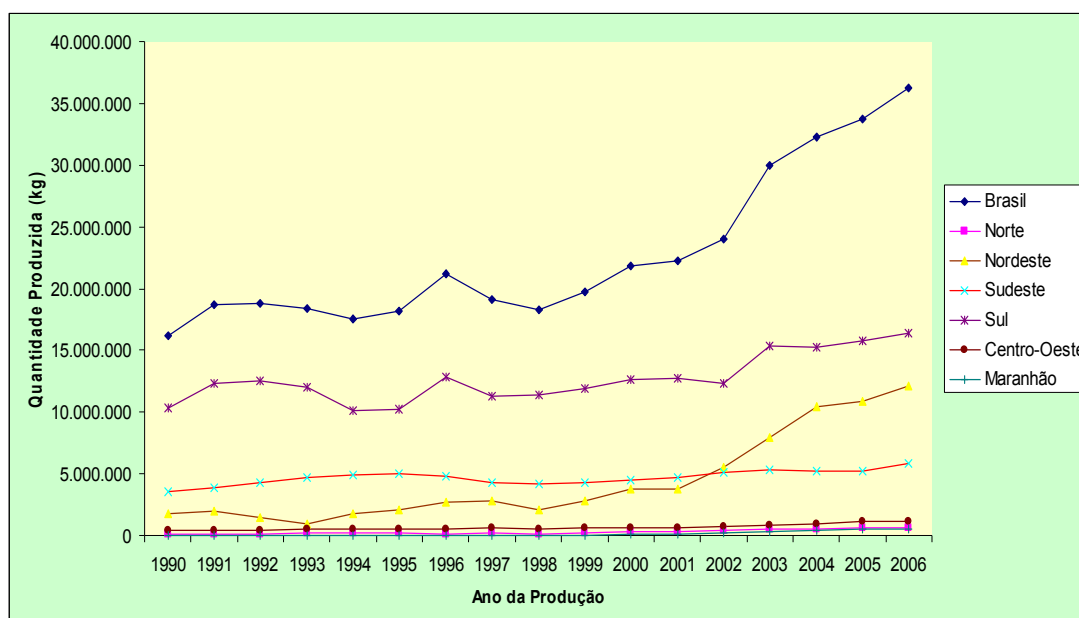


Figura 1 – Produção de mel no Brasil.

Fonte: adaptado de [30]

Segundo dados do IBGE [31] o Maranhão, no ano de 2005, passou a ocupar a 10ª posição no *ranking* nacional, tendo alcançado um aumento de produção de 289 % em relação à estatísticas realizadas pelo mesmo órgão no ano de 2001, comprovando-se o grande potencial de produção do estado.

1.1.1 Características físico-químicas do mel

O mel (Figura 2) é um produto biológico muito complexo, devido a sua composição variar com a flora e ser influenciado pelas condições climáticas e edafológicas da

região onde foi produzido [32]. Segundo Crane [33] mel é o resultado da desidratação e transformação do néctar, portanto a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar.



Figura 2- Diferentes tipos de mel.

Fonte: Internet: [34]

A composição físico-química do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais também estão diretamente relacionados com a fonte do néctar que o originou e assim como com a espécie da abelha que o produziu [32]. A Tabela 1 apresenta uma visão geral da composição química do mel.

Tabela 1 - Composição típica do mel.

Componente	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76-1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 -40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020-1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	----
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68-59,49	10,33
Proteína (%)	0,1686	0,0577-0,567	7,09

Fonte: NATIONAL HONEY BOARD [35].

Sabor e aroma. O sabor e aroma característicos do mel são conferidos pela presença dos compostos voláteis. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado

diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-los dos favos [36]. Os aromas podem ser classificados em característico, adocicado, floral, cera e queimado. Já o sabor pode ser classificado como característico, adocicado, floral, cera, queimado, ácido e residual.

Cor. “A coloração do mel” é normalmente interpretada como algo mais escuro que creme e mais claro que marrom. A cor do mel líquido pode realmente variar de branco-aquoso a próximo de preto, com variantes tendendo para matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul [33].

Água. O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% [37]. Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. A quantidade de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade [32].

Açúcares. O poder adoçante do mel é avaliado em cerca da metade do atribuído ao mesmo peso de açúcar de cana [33]. Além da doçura, os açúcares são responsáveis por outras características, tais como: capacidade de conservação, poder higroscópico e habilidade de promover cor e sabor [38]. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5% a 40% para a glicose e de 36,2% a 49,6% para a frutose, de acordo com a florada [39].

Diversos. Outros componentes importantes presentes no mel são as enzimas, os aminoácidos, os ácidos orgânicos e minerais.

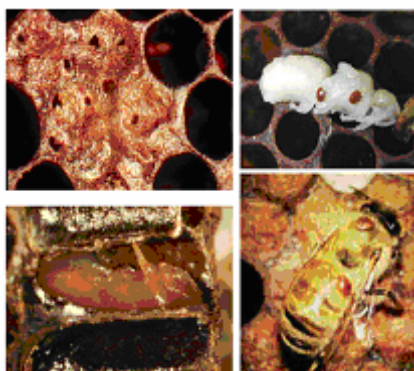
1.1.2 Doenças nas abelhas e na colméia

Assim como em seres humanos as abelhas são susceptíveis a numerosas enfermidades, necessitando de tratamentos adequados à base de fármacos como as sulfonamidas para prevenção e/ou tratamento destas. Na Figura 3 são apresentadas as doenças que mais afetam abelhas e colméias. Dentre as enfermidades que mais as afetam está a cria pútrida.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (*American Foulbrood*), é produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas [40; 41]. O tratamento ocorre pela administração dos antibióticos na água ou através de alimentação artificial contendo a medicação, geralmente administrada, antes da florada [42].

Este tipo de doença quando acontece é capaz de dizimar dezenas de colméias, sendo uma enfermidade muito temida pelos apicultores.

O Brasil tem se destacado no cenário internacional por ter praticamente erradicado esta doença. A grande questão que envolve doenças na apicultura, assim como em outras atividades produtoras de alimentos, é a utilização de fármacos na prevenção ou tratamento destas. As sulfonamidas são compostos que podem ter sua ação prolongada por muito tempo dependendo do tipo de matriz a qual ela está presente [43]. O uso inadequado de fármacos na prevenção ou controle de doenças na colméia pode acarretar danos a qualidade do produto e causar problemas na saúde do consumidor, uma vez que a contaminação do mel com resíduos de sulfonamidas numa colméia mantém-se durante anos.



(a)

(b)

Figura 3 – Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas:
(a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.
Fonte: Internet: [44]

1.2 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, tendo sido desenvolvidas em 1935, pelo cientista Gerhard Domagk [45]. São compostos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Figura 4). Sua classificação é realizada com base no grau de absorção pelo trato gastrointestinal e através da duração de seu efeito [46].

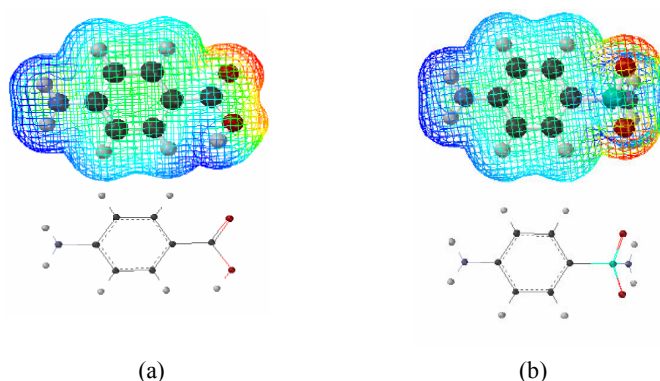


Figura 4 - Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida).
Fonte: Internet: [47]

Possuem ação bacteriostática e atuam competindo com o ácido *p*-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico, agindo de forma sistêmica, com ação de curta ou longa duração, dependendo do tipo [48].

Os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana das sulfonamidas estão reunidos na própria molécula da sulfanilamida. O grupo – SO₂NH₂ não é essencial em si, mas tem a importante característica do enxofre estar diretamente ligado ao anel benzênico [48].

Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, *pKa*, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica [48].

Quimicamente, as sulfonamidas são ácidos fracos, relativamente insolúveis em água, que apresentam *pKa* variado e são iônicas por natureza [49]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas relevantes das sulfonamidas em estudo nesta pesquisa.

Tabela 2 – Propriedades gerais das sulfonamidas.

Composto	CAS- Number	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)*	Sol. em H ₂ O* (mg /100 mL)	Log K _{ow}	<i>pKa</i>
Sulfadiazina	[68-35-9]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.26	13	0,12 ^b	6,50
Sulfadimetoxina	[122-11-2]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1	1,4 ^a	6,21
Sulfadimidina	[57-68-1]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	272.33	192	0,25 ^a	7,45
Sulfatiazol	[72-14-0]	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.32	1	--	7,24

Fonte: *[50] ; ^a [27]; ^b [51]

A solubilidade das sulfonamidas varia muito em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional. Em meios alcalinos a solubilidade é maior que em pH neutro e ácidos, aumentando em meio ácido de sais sódicos [52].

Em sua molécula as sulfonamidas contêm um grupo amina básico (-NH_2) e um grupo amida ácido (-NH-) que correspondem ao pK_{a1} e pK_{a2} , respectivamente; apresentando caráter anfótero, ou seja, em soluções básicas o comportamento das sulfonamidas é ácido, devido ao N1 (nitrogênio ácido, que apresenta capacidade de doar prótons), já em soluções ácidas o comportamento das sulfonamidas é básico, devido ao N4 (nitrogênio básico - que apresenta capacidade de captar prótons). A completa ionização é conseguida quando o pH do analito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de pK_a , para compostos ácidos e básicos, respectivamente [53].

Na Figura 5 é apresentado um esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio. Em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

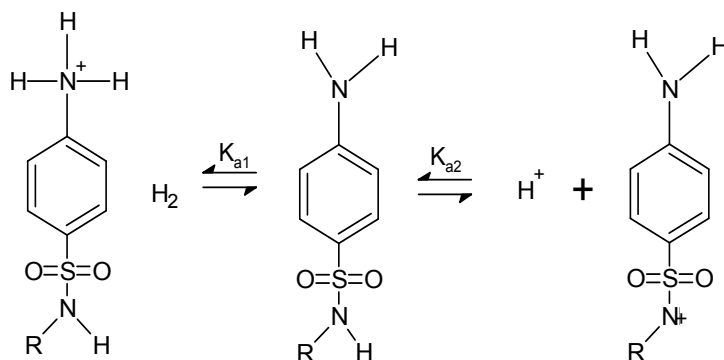
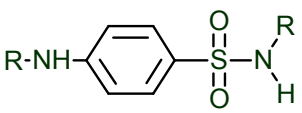
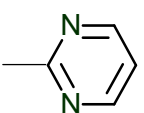
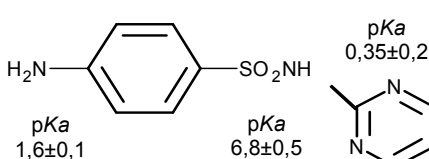
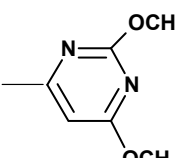
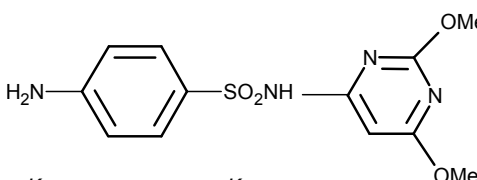
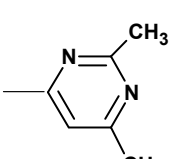
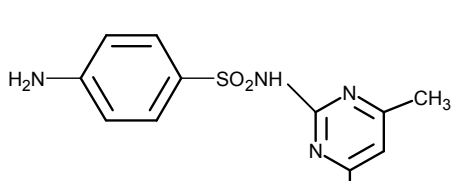
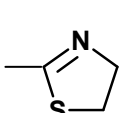
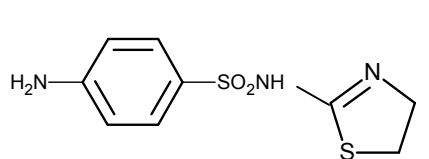


Figura 5 – Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.
Fonte: [53]

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares das sulfonamidas selecionadas para este estudo, bem como as variações dos valores de pK_a dos respectivos grupos funcionais das sulfonamidas.

Fórmula Geral das Sulfonamidas		
		
Sulfonamida	Radical	Estrutura Completa
Sulfadiazina (SDZ)		 pK_a 1,6±0,1 pK_a 6,8±0,5 pK_a 0,35±0,2
Sulfadimetoxina (SDX)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfadimidina (SDD)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfatiazol (STZ)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5

Quadro 1 – Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo
 Fonte: adaptado de [51], [54] e [23].

1.2.1 Resíduos de sulfonamidas no mel

No que se refere à saúde pública, o monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos vem-se tornando um assunto cada vez mais discutido em nível mundial [51]. Uma grande variedade de fármacos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses,

os das classes: sulfonamidas, betalactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos [55].

Atualmente, grandes volumes de mel são solicitados por mercados internacionais, fazendo com que novas práticas apícolas sejam implantadas a fim de garantir que a produção esteja protegida de possíveis ataques de pragas, doenças ou contaminações [3].

A utilização de fármacos na prevenção e/ou tratamento de doenças na colméia é prática comum entre os apicultores. Resíduos de sulfonamidas podem ocorrer no mel como consequência da utilização destes fármacos no tratamento de doenças de origem bacteriana. A presença de resíduos de sulfonamidas no mel não é desejável, uma vez que o mel é um produto natural e saudável e que, como tal, não deve apresentar substâncias comprovadamente tóxicas.

As exposições de humanos a doses de resíduos de fármacos podem gerar possíveis efeitos prejudiciais à saúde do consumidor. Os efeitos mais comumente encontrados são reações alérgicas, desordens na flora intestinal e possível impacto da resistência de antimicrobianos utilizados em terapia humana. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se, ainda, que aproximadamente 5% dos pacientes humanos tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [56]. Deve-se salientar, entretanto, que ainda não existem evidências científicas demonstrando que esta associação seja decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [57].

1.2.2 Aspectos da legislação

Visando proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores em saúde pública estabeleceram níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) quanto à presença de fármacos em alimentos de origem animal [57]. O LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduo com o qual não ocorra perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) [52].

No Brasil, o Ministério da Saúde é quem estabelece os LMR e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os responsáveis pelas ações fiscais de vigilância do uso de fármacos em alimentos.

Na produção de produtos de origem animal o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do MAPA. O PNCR tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do mel e de outros produtos de origem animal, no território nacional, bem como o aporte dos produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas aos conhecimentos das violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais. Para isto, são colhidas amostras dos alimentos, junto aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) [57].

O LMR de sulfonamidas em mel fixado pelo PNCR é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina (Quadro 01, ANEXO 1).

A ANVISA, recentemente, vem implantando um Programa de Análise de Resíduos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) para diversos tipos de alimentos (leite, carnes, ovos e mel de abelhas), cujo objetivo é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária [58].

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

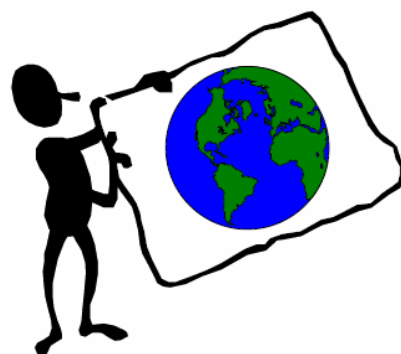
2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para determinar sulfonamidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Comparar diferentes tipos de processos de extração/pré-concentração de sulfonamidas, utilizando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de méis;
- Divulgar a problemática envolvendo a presença de fármacos em alimentos.

3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS



3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que procedimentos de controle de qualidade de alimentos sejam realizados a fim de verificar a presença de resíduos de sulfonamidas e outros contaminantes. O desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença destes resíduos em diferentes matrizes alimentícias tornam-se fundamentais [52]. Segundo Davidson e Branem [59], o monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de medicamentos veterinários tem aumentado devido à importância da repercussão em saúde pública.

A determinação de resíduos de sulfonamidas envolve quantificação de concentrações muito baixas, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. As técnicas analíticas mais comumente usadas para a quantificação destes resíduos são as cromatográficas, associadas a diferentes sistemas de detecção, tais como UV, arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas [52].

A cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos tem sido utilizada com êxito para determinar vários resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal [18]. Embora atualmente muitos métodos confirmatórios como, o CLAE-EM/EM, para a determinação de sulfonamidas em alimentos sejam citados na literatura, estes tipos de determinação requerem o uso de equipamentos caros sendo, portanto, de menor disponibilidade na maioria dos laboratórios de química, principalmente em universidades [60].

A análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento, extração e/ou *clean up* da amostra [49] devido à necessidade de separar, de uma matriz orgânica complexa, compostos em concentrações bastante baixas, de forma a minimizar a presença de interferentes na matriz.

Vários métodos de determinação das sulfonamidas em alimentos estão disponíveis na literatura internacional. Dentre os trabalhos sobre resíduos de sulfonamidas em mel por HPLC pode-se destacar: ZOTOU e VASILIADOU [11]; MAUDENS, ZHANG e LAMBERT [61]; MARTEL e ZEGGANE [62]; PANG *et al.* [63]; HORIE *et al.* [64]; dentre outros.

Zotou e Vasiliadou [11] desenvolveram um método seletivo para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel por SPE-RP-HPLC com detecção UV. A separação das sulfonamidas foi realizada usando coluna C18 (ODS-3), no modo isocrático, e como fase móvel utilizou-se metanol e solução-tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com 1% de ácido acético

(v/v). A detecção UV foi em 263 nm. As amostras de mel foram diluídas em solução-tampão acetato (0,05M) pH 3,6. Utilizou-se cafeína como padrão interno. A extração do resíduo foi realizada usando extração em fase sólida com cartuchos de fase polimérica (Nexus). Recuperações médias dos analitos variaram de 80 a 117%, com limites de detecção de 20 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Maudens, Zhang e Lambert [61] desenvolveram e validaram um método para determinação de doze sulfonamidas (sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina e sulfadoxina) em mel. O pré-tratamento da amostra incluiu uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L⁻¹, seguida por extração líquido-líquido e extração em fase sólida (utilizando cartucho de troca catiônica). A separação foi realizada utilizando-se coluna RP18, no modo gradiente, e com fase móvel constituída de acetonitrila e solução-tampão acetato (0,020 mol L⁻¹) pH 4,75. A detecção foi realizada em comprimento de excitação de 420 nm e comprimento de emissão de 485 nm. O método demonstrou boa exatidão e precisão. O pré-tratamento da amostra aumentou a eficiência do *clean up*. Foram encontradas recuperações médias, nos três níveis, variando de 38,2 a 66,8% e limites de detecção e quantificação de 1 ou 2 e 2 ou 5 ng g⁻¹, respectivamente.

Martel e Zeggane [62] descreveram um método para determinação de sulfatiazol em mel. Foi realizada uma etapa de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. Uma alíquota da amostra hidrolisada utilizando ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ e submetido a uma pré-coluna de derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com detector por fluorescência, usando coluna C18 (Hypersil BDS), no modo isocrático, e com fase móvel composta de acetonitrila e solução de ácido acético 2%. Para a detecção por fluorescência foi aplicado um comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. O limite de quantificação foi de 10 ng g⁻¹. As recuperações variaram de 60,6 a 71,8%. A estimativa do desvio padrão relativo variou na faixa de 0,5 a 2,9%.

Pang *et al.* [63] desenvolveram um método para a determinação de oito sulfonamidas (sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido fosfórico (pH 2). As amostras foram filtradas e em seguida procedeu-se à extração em fase sólida utilizando-se dois cartuchos um de troca catiônica e outro OASIS HLB. Procedeu-se à derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada por cromatografia líquida por detecção por fluorescência, usando coluna RP 18, no modo

isocrático, e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e solução de dihidrogeno-fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹. A detecção foi realizada com comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. Recuperações médias nos três níveis de fortificação variaram de 73,5 a 94,1% e coeficientes de variação de 4,35 a 16,60%. O limite de detecção foi de 0,002 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina, e 0,005 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina. O limite de quantificação foi de 0,005 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina e 0,010 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

Horie, Satto e Nose [64] desenvolveram um método usando cromatografia líquida por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) para a determinação simultânea de dez sulfonamidas (sulfatiazol, sulfacloropiridazina e sulfaquinoxalina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 30% e, então, extraídas com diclorometano. Os extratos foram percolados em cartucho de Florisil para realizar um *clean up* na amostra. A separação cromatográfica foi realizada em coluna RP-18 (Lichosphere), como fase móvel utilizou-se solução de dihidrogeno fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹) e acetonitrila. A detecção foi a 275 nm. As recuperações no nível de 0,05 µg g⁻¹ foram de 62,1 a 90,2% e os limites de detecção foram 0,05 µg g⁻¹ para cada composto.

Na Tabela 3 são apresentados métodos cromatográficos assim como os métodos de extração reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em mel e em outras matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
HAMMEL <i>et al.</i> [22]	Mel	SDZ,SMR,STZ,SPD, SAD,SMZ,TAP,SME, DAP,SID,SMTX,SDM, STR,DHS,CAP,SBM, OTC,AMP,TC,SDX, SQX,DMC,CTC,NEO, PENG,SPI,DC,PEN, DES,OLE,TIL,TYL, OXA,EA,CLOX,NAF, DIC,ROXI,AMOX,SCP	HPLC-ESI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 26-61% e Limites de detecção de 31,3-49,0 µg/kg
WANG <i>et al.</i> [65]	Mel e frango	SMT, SMR e SDZ	HPLC-DAD Imunoensaio com polarização fluorescente	Foram encontradas recuperações de 86-131%. Limites de detecção de 0.9 ng g ⁻¹ 3.1 ng g ⁻¹ .
TAMOSUNAS e PADARAUSKAS [66]	Mel e ovos	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPLC-MS/MS UPLC-MS/MS LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 80-110%. Limites de decisão de 6.61-9.43 µg kg ⁻¹ and 7.25-11.9 µg kg ⁻¹ para UPLC e LC, respectivamente.
GRANJA <i>et al.</i> , [67]	Mel	STZ, SMZ E SDM	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 61.0% a 94.5%. Limites de detecção de 3 µg kg ⁻¹ , 4 µg kg ⁻¹ and 5 µg kg ⁻¹ respectivamente
ZOU <i>et al.</i> , [68]	Mel	STZ, SPD, SDZ, SMR, SMMX, SCP, SMX, SDM	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações > 70%. Limites de detecção 4 µg kg ⁻¹ .
MOHAMED <i>et al.</i> [24]	Mel	SAD,DAP,SPD,SDZ, SMTX,STZ,SMR,SMX, SMP,SME,SCP,SQX, SDX,SDT,SSZ	HPLC-APPI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,4% e Limites de quantificação de 10 µg/Kg
KOESUKWIWAT <i>et al.</i> [23]	Leite	SDZ,STZ,SMZ,SMP, SMX,SDM,CTC,TC OTC,PYR	HPLC-ESI-MS SPE	Foram encontradas recuperações de 5-166% (nos vários níveis)
SUN <i>et al.</i> [9]	Envoltório para salsicha (tripa de origem animal)	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMDZ,SMT,SMMX, SMP,SIA,SMX,SDM, SQX	HPHPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 65,2-85,9%. Limites de detecção de 0,3-0,4µg/kg e limites de quantificação de 1,5-2,2 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
LU <i>et al.</i> [25]	Carne (suína)	SDZ,STZ,SMR,SMT, SMMX,SMXZ,SQX, SDMX	HPLC-ESI-MS HPLC-APCI-MS SPME	Limites de detecção de 16-39 µg/Kg e limite de quantificação de 53-130 µg/Kg
KISHIDA [26]	Carne (bovina, aves, suína)	SDD,SDZ,SMM,SMX, SDM,SQX	HPLC-MS MSPD	Foram encontradas recuperações de 90,5-97,6% e Limites de quantificação de 0,006-0,04 µg/g
GARCÍA <i>et al.</i> [17]	Visceras de animais (rim)	SDZ,SMT,SMP,SMX SDM,SQX	HPLC-DAD LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 46-63%. Limites de decisão de 3,48-3,84 µg/Kg e Capacidade de detecção de 109,8-161,7 µg/Kg
BISWAS <i>et al.</i> [69]	Carne (búfalo)	TMP,SDD,SDX,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 75-108%. Limite de detecção de 0,031µg/g e limite de quantificação de 0,062 µg/g
FELTRIN <i>et al.</i> [10]	Leite	SDX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 76-90% e limite de detecção de 4,59µg/L e limite de quantificação de 13,9 µg/L
ZOTOU e VASILADOU. [11]	Mel	SCT,STZ,SPD,SMR SMP,SMX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 80-117% e Limites de detecção de 20-25µg/Kg
WANG <i>et al.</i> [49]	Produtos de origem animal	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPHPLC,HPCE, THPLC,ELISA, IMUNOENSAIOS LLE,SPME,SPE	Vários artigos sobre sulfonamidas em alimentos de origem animal
GALLINA <i>et al.</i> [12]	Mel	Streptomycina, Tylosin, SAD,SDZ,STZ,SMZ, SDX,SMTX,SDM	HPLC-FL LLE	Foram encontradas recuperações de 11,5-96,5%. Limites de detecção de 1,7-22ng/mL e limites de quantificação de 5,5-75 ng/mL
PECORELLI <i>et al.</i> [70]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SMMX,SCP,SMX SQX,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 62,4-85,1% e Limite de decisão 105,3-109,5 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
KISHIDA e FURUSAWA [19]	Carne (aves) e ovos	SMM,SDM,HIDRÓXI/N ⁴ -ACETIL	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 90-97% e limites de detecção de 7,2-29,8 ng/mL
LAMBA <i>et al.</i> [71]	Leite	SAD,SGN,SDZ,STZ, SMTX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 85-114%. Limites de detecção de 1,59-7,68 nmol/L e limites de quantificação de 5,3-25,59 nmol/L
PANG <i>et al.</i> , [72]	Mel	STZ, SCT, SAI, SMM, SDX,SDZ, SPD, SCP, SMTX, SMR, SMP, SDM, SMZ, SME	HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70.9-102.5%. Limites de quantificação de 1.0 and 12.0 µg/kg
POSYNIK <i>et al.</i> [73]	Carne (frango)	SDZ,SMZ,SMX,SMR, SDM,SMP	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações de 90-95%. Limites de detecção 1 ou 5 µg/Kg CCα: 103,8-127,6 µg/Kg CCβ: 115,0-137,4 µg/Kg
MAUDENS <i>et al.</i> [61]	Mel	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SME, SMT,SMP,SCP,SDX	HPLC-FL LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 37,4-66,8%. Limites de detecção de 1-2 ng/g e limites de quantificação de 2-5ng/g
PECORELLI <i>et al.</i> [18]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SQX,SDM,SCP, SMM,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 51-109% CCα: 105,2-116,2 µg/Kg CCβ: 110,9-134,9 µg/Kg
GENTILI <i>et al.</i> [60]	Carne e alimentos infantis	SID,SDZ,SPD,SMR, SMO,SMZ,SMT,SMP, SMM,SCP,SMX,SQX, SDM	HPLC-MS/MS	Foram encontradas recuperações de 70-101%. Limite de detecção de 2,6 ppb e limites de quantificação de 1,2-7,8 ppb
ZAYAS-BLANCO <i>et al.</i> [13]	Leite	SMZ	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 82,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 3µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
POSYNIAK <i>et al.</i> [74]	Mel	SCT,STZ,SMZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80%. Limites de detecção de 0,1µg/Kg e limites de quantificação de 0,2 µg/Kg
PANG <i>et al.</i> [63]	Mel	SCT,SPD,SMR,SMP, SME,SCP,SMX,SDM	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 73,5-94,1%. Limites de detecção de 0,005mg/Kg e limites de quantificação de 0,002 mg/Kg
REYBROECK [75]	Mel	Streptomycin, Tetracyclines, Cloranfenicols, SMZ, STZ,SCT	HPLC-UV	Limites de detecção para as sulfas de 25-50µg/Kg e limite de quantificação para as sulfas de 20µg/Kg
MARTEL e ZEGGANE [62]	Mel	STZ, SMZ	HPLC-FL IMUNOENSAIO DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 2µg/Kg
FURUSAWA [21]	Leite	OTC,SDD	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 88,8-93,1%. Limites de quantificação 0,044 µg/mL (OTC) e 0,023 µg/mL(SDD)
POSYNIAK <i>et al.</i> [76]	Mel	SCT,SMT,STZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80,9-83,4%. Limite de detecção de 0,1-0,5µg/Kg
HELLER <i>et al.</i> [77]	Ovos	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SMZ, SMT,S P,SCP,SMX, SMMX,SIA,SDM,SQX	HPLC-MS-MS HPLC-UV LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 51-103%
FURUSAWA [14]	Leite	SMZ,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 81-94%. Limites de detecção de 5-10ng/mL e limites de quantificação de 3-5ng/mL

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
STOEV e MICHAILOVA [78]	Produtos de origem animal	SAD,SDZ,SMR,SDD, SMP,SOX,SMX,SDM, SQX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 64-75% e Limites de detecção de 0,5-1,0 µg/g
ITO <i>et al.</i> [79]	Visceras de animais (rins e fígado)	SDZ,SMR,SDD,SMP, SAI,SMMX,SMTX, SDM,SQX	HPLC-UV HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70,8-98,2% e Limites de detecção de 0,03 µg/g
FURUSAWA [80]	Leite	SMZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações maiores que 83% e Limites de detecção de 4 µg/kg
HEERING <i>et al.</i> [81]	Mel	TC, Streptomycin, STZ	Imunoensaio - EIA	Foram encontradas recuperações de 100-105%. Limites de detecção de 50 µg/g
GEHRING <i>et al.</i> [82]	Salmão	SDZ	HPLC-API/MS	Foram encontradas recuperações de 59,2-78,3%. Limite de detecção de 0,2 ng/g e limite de quantificação de 1,0 ng/g
CANNAVAN <i>et al.</i> [83]	Carne	SMT	CG-MS SPE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 86-114% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
VIÑAS <i>et al.</i> [84]	Leite	SA,SGN,SDZ,SPD,SMX	HPLC-FL LLE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 82-104% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
HORIE <i>et al.</i> [64]	Mel	STZ,SDZ,SMR,SMP, SDD,SMMX,SCP, SMX,SQX,SDM	HPLC-DAD SEM EXTRAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 62,1-90,2%. Limites de detecção de 0,8µg/g
AGARWAL [15]	Leite	SDZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 83-88%
PATHY [85]	Carne	SQX	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 77-85%

3.1 PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise de quantidades muito pequenas (traços) de contaminantes em matrizes complexas como alimentos frequentemente requerem inúmeras etapas de preparação e extração de amostras antes das técnicas de análises instrumentais (detecção e quantificação). Dentre as várias etapas envolvidas na preparação de amostras, alguns passos são mais comuns, tais como amostragem (homogeneização), extração, *clean-up* (eliminação de interferentes), separação e concentração, detecção e quantificação dos analitos [86].

Técnicas, como a cromatografia a líquido, requerem uma etapa de preparo da amostra antes da análise, de forma a minimizar erros na análise e evitar danos nas colunas cromatográficas [87].

Atualmente existem vários métodos para o preparo de amostras, com inúmeras possibilidades, vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método quando se trabalha com matrizes complexas, como alimentos, exigem que o analista tenha o conhecimento tanto da matriz com a qual se está trabalhando assim como da técnica instrumental que será utilizada posteriormente para a detecção/quantificação do composto, a fim de evitar, principalmente, que interferentes possam ser co-eluídos juntamente com os analitos de interesse e efeitos de matriz sejam incluídos nos resultados [88].

Segundo Queiroz, Collins e Jardim [89], as técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo do analista gasto durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras em determinado tempo.

Dentre as técnicas de extração mais comumente utilizadas para concentrar analitos em mel pode-se destacar a extração em fase sólida (EFS) [11; 63; 72; 73 e 74], extração líquido-líquido (LLE) seguida de EFS [61], e extração líquido-líquido [12 e 22].

3.1.1 Extração por Fase Sólida (EFS)

A extração por fase sólida é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [88]. O método de extração por fase sólida foi desenvolvido na década de 70, visando resolver algumas desvantagens da extração líquido-líquido e otimizar rotinas [90].

É uma técnica que consiste na separação líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica, através da qual a solubilidade de interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição [88; 91]. Através de forças intermoleculares, do tipo das de Van der Waals ou dipolo-dipolo, entre o analito e a superfície adsorvente da fase sólida ocorre o mecanismo de retenção e eluição dos analitos. Dependendo do grau de afinidade do analito com o solvente de eluição, este terá maior ou menor retenção [88].

A extração por fase sólida tem vários objetivos [87], sendo eles:

- (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;
- (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes;
- (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito; e
- (d) estocagem da amostra, muito usada para evitar o transporte de grandes volumes das mesmas.

Existem dois tipos de sistemas de extração por fase sólida: em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema em linha, a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. No sistema fora de linha (*off-line*), a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor [91]. Nesta pesquisa, utilizou-se o método de extração em fase sólido com sistema off-line.

Na prática, para uma extração por fase sólida são utilizados tubos de polipropileno no formato de seringa, contendo a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia), usualmente denominada cartucho de extração [88], conforme mostrado na Figura 6.

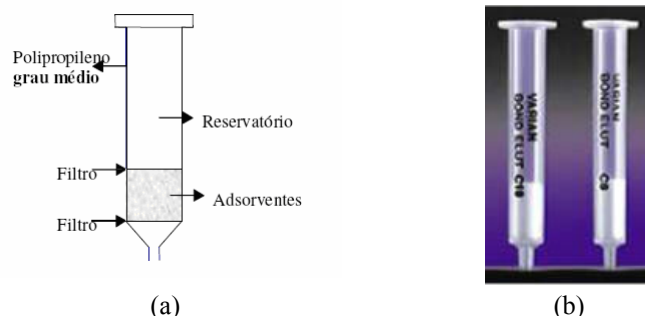


Figura 6 – (a) Esquema de cartucho para extração EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.
Fonte: (a) [88]

O atual estágio de desenvolvimento da extração em fase sólida deve-se em grande parte às descobertas de novos adsorventes [89]. No Quadro 2 são apresentados os principais tipos de adsorventes utilizados em extração em fase sólida.

Quadro 2 - Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.

Não-polares	Polares	Troca Iônica
Octadecilsilano – C18	Florisil – FL	Benzenossulfonilpropilsilano – SCX
Octilsilano – C8	Alumina – Al	Sulfonilpropilsilano – PRS
Etilsilano – C2	Sílica – Si	Carboximetilsilano – CBA
Metilsilano – C1	Cianopropilsilano – CN	Dietilaminopropilsilano – DEA
Fenilsilano – PH	Diolsilano – 2OH	Trimetilaminopropilsilano – SAX
Cicloexilsilano – CH	Aminopropilsilano – NH ₂	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA
	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA	
	Poliméricas (Nexus)	

Fonte: adaptada de [91]

Recentemente, alguns estudos visando desenvolver fases de EFS com aplicações mais específicas têm sido desenvolvidos. As fases poliméricas são exemplos típicos destas fases, as quais possuem maior capacidade de retenção que as de sílica, tendo seletividade usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel [93].

Na Figura 7 é apresentado um esquema do procedimento de extração em fase sólida. Na etapa A, ocorre a ativação e condicionamento do cartucho; na etapa B, ocorre a aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; na etapa C, ocorre a troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*) e, por último, na etapa D ocorre a troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

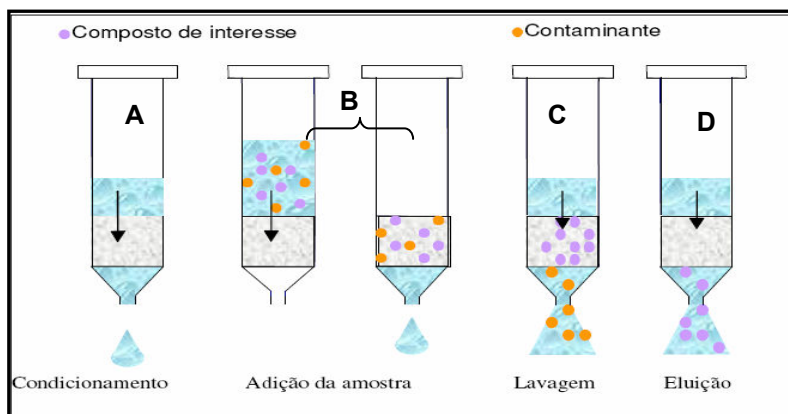
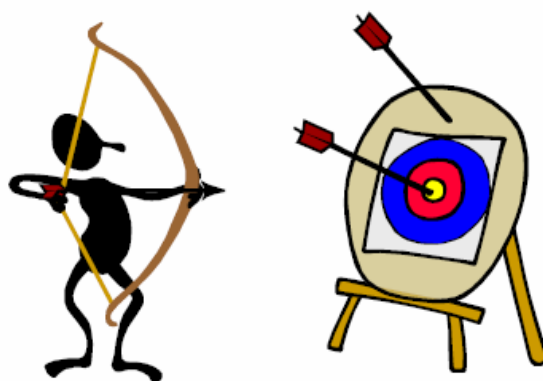


Figura 7 - Principais etapas empregadas em extração por fase sólida (EFS).

Fonte: [87]

Na prática, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com um pequeno vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Após a drenagem de toda a fase líquida, os analitos de interesse ficarão retidos na fase sólida do cartucho. O analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito pré-concentrado, ou seja, com a concentração apropriada para a análise [88].

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO



4.VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nenhuma análise química, automatizada ou manual, fornece resultados isentos de erro. Geralmente, os resultados são reportados em forma de valores numéricos que contêm informações que devem ser corretamente interpretadas e avaliadas, de acordo com as especificações do método e as necessidades de cada usuário do mesmo resultado [93]. Neste contexto, dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico, ou mesmo a adaptação de um método já existente, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [94].

Segundo o INMETRO [95], a validação de um método de ensaio é a denominação que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida. O processo de validação de métodos analíticos desenvolvidos em laboratórios é efetuado após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos. Para Barros [96] a validação do método analítico permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [97] e que envolve várias etapas. A NBR/ISO IEC 17025 [98] define que um processo de validação deve incluir a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método. Todo processo de validação deve ser abrangente o suficiente, de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos [97].

Existem vários órgãos internacionais responsáveis por processos de validação, que estabelecem muitos conceitos e procedimentos sobre este processo, gerando um grande volume de informações. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os responsáveis por processos de validação. Estes órgãos disponibilizam guias, diretrizes ou mesmo normas, para o procedimento de validação de métodos analíticos.

No Quadro 3 são apresentados os principais critérios utilizados para a validação de métodos segundo os mais reconhecidos órgãos de regulamentação, nacionais e internacionais.

Quadro 3 - Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO	ICH	USP	IUPAC
Especificidade/Seletividade	x	x	x	x	x ¹
Faixa de trabalho e Faixa linear	x	x	x	x	x
Linearidade	x	x	x	x	x ¹
Limite de Detecção	x	x	x	x	x
Limite de Quantificação	x	x	x	x	x
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	-	-	-	x
Exatidão e tendência	x ¹	x	x ¹	x ¹	x
Precisão (repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade)	x ²	x	x ¹	x ¹	x
Robustez	x	x	x	x	x
Incerteza de medição	-	x	-	-	x

¹ - Realiza calibração; ² - Não realiza tendência

Os principais parâmetros utilizados para a validação de métodos cromatográficos são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez [97]. A Figura 8 mostra um fluxograma com as etapas do procedimento analítico para a validação do método para análise de resíduos de sulfonamidas em mel proposto neste trabalho.

4.1 FAIXA DE APLICAÇÃO

A faixa de aplicação de um método refere-se ao intervalo entre a concentração superior e inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade [99].

Na prática a faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, e é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão [99].

Segundo Thompson *et al.* [100], a IUPAC estabelece duas faixas de aplicação, uma para impurezas (0-150%) e outra para macro-componentes (50-150%), sendo que o valor esperado deve estar contido dentro de uma destas duas faixas. A AOAC [101] recomenda que, para análise de traços, a faixa seja compreendida entre o limite de quantificação e duas ou três vezes o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Na análise de fármacos, a ANVISA indica uma faixa de aplicação entre 80-120% da concentração teórica do analito, e recomenda que seja determinado intervalo linear de, no mínimo, 5 níveis de concentração diferentes [102].

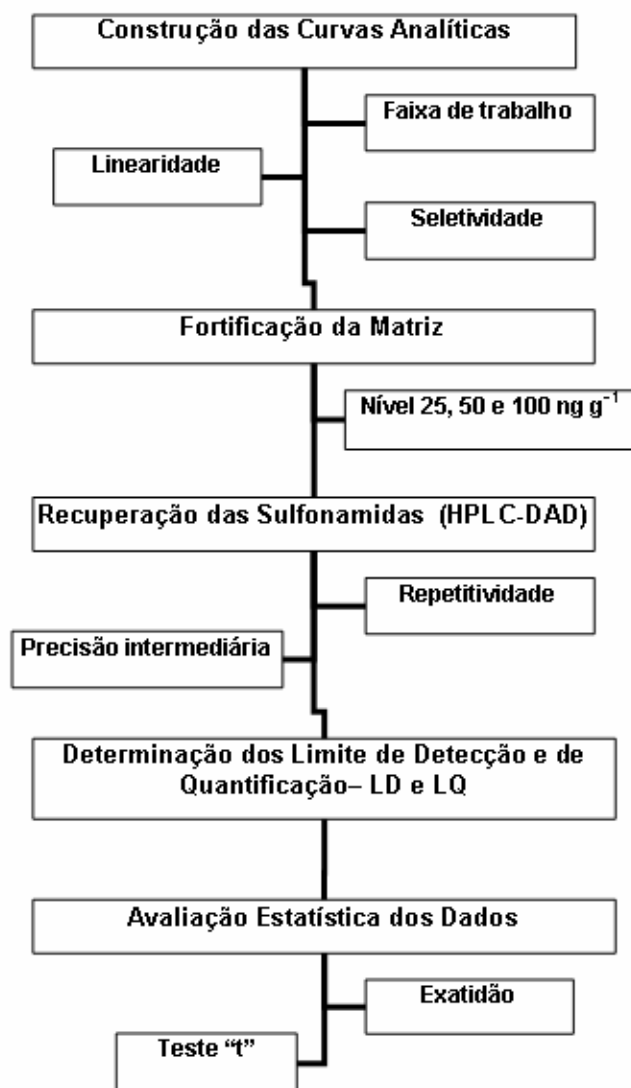


Figura 8 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação [97].

A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico [103]. Na maior parte das vezes uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito deve ser determinada empiricamente e pode ser representada como uma equação de reta, geralmente chamada de curva analítica ou gráfica de calibração, que representa a resposta de um método analítico como função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido [104].

Segundo Hubert *et al.* [105] uma outra forma de se avaliar a linearidade é por meio da relação entre concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear.

Em geral recomenda-se que o coeficiente de correlação seja maior que 0,990, sendo considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a regressão [95]. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [97].

4.3 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método analítico determinar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz [103]. A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da matriz, tais como, impurezas, ingredientes ativos, excipientes, e outros compostos de formas similares que possam estar presentes [106].

A seletividade é um parâmetro muito importante quando se trabalha com análises de multiresíduos. Deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, não sendo um parâmetro a ser realizado uma única vez, e sua realização deve ocorrer de forma contínua. Conhecer os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a análise ajuda na escolha das melhores condições para detecção. É através da seletividade que se garante que o pico cromatográfico seja o do composto em estudo [97].

4.4 PRECISÃO

A precisão refere-se à proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas [99]. Pode ser expressa pelo desvio dos resultados em relação à sua média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV) [97], conforme apresentado na equação 1.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{X}$ = média das recuperações.

Em análises de traços são aceitos valores de RSD de até 20%, já para métodos que quantificam compostos em macro-quantidades, o RSD deve ser de 1 a 2%. A precisão também pode ser melhorada através de um maior número de replicatas [107].

Comumente, a precisão de um método analítico em validação de métodos pode ser expressa como repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade [100].

4.4.1 Repetitividade

A repetitividade (ou repetibilidade) refere-se à precisão entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições, equipamentos, analistas, em um curto intervalo de tempo [99]. O INMETRO [95] recomenda sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r').

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo a mais aconselhável de ser adotada. Tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente os resultados não tenham diferença [99; 97]. O número de ensaios para a precisão intermediária segue a mesma recomendação que para a repetitividade segundo INMETRO [95].

4.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, ou seja, em localidades diferentes, utilizando um mesmo conjunto de amostras [103]. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratoriais), e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em legislações, ou farmacopéias etc... [97].

4.5 EXATIDÃO

A exatidão é estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [103]. Sempre se considera a exatidão dentro de certos limites, a um dado nível de confiança [97]. Para a ANVISA [58] e o ICH [99] é necessário um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração.

Os procedimentos mais recomendados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do analito. Para a análise de matrizes biológicas, como alimentos, os ensaios de recuperação são os mais utilizados [97; 103].

4.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação pode ser definido como a quantidade de analito presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada [100]. A recuperação está relacionada com a exatidão, porque reflete a quantidade de determinada substância recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra [103].

Na prática, o estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, também sendo denominada de fortificação. A equação 2 apresenta a relação utilizada para os cálculos da percentagem de recuperação.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

Na Figura 9 é mostrado o esquema proposto por Brito [108] para representar o processo de fortificação.

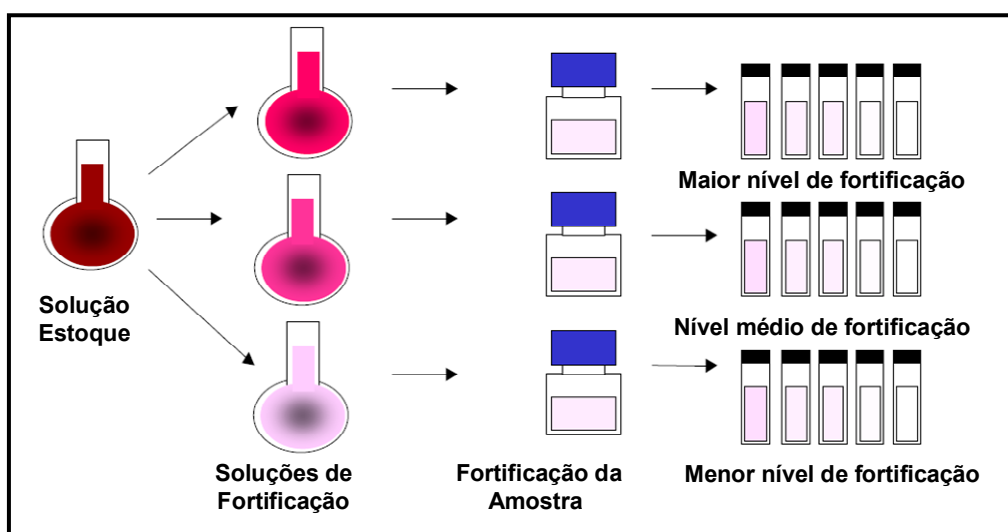


Figura 9 - Processo de fortificação das amostras.
Fonte: [108]

A limitação do procedimento de recuperação baseia-se no fato de que a substância adicionada não se apresenta na mesma forma que a encontrada originalmente na amostra, devendo-se ter o cuidado de reproduzir ao máximo as condições originais da amostra. Outro fator limitante para os ensaios de recuperação é o efeito da matriz, uma vez que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, sendo necessário investigar e eliminar estes efeitos dos interferentes [104].

Para garantir que os resultados sejam confiáveis é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, devendo-se avaliá-la na faixa de concentração esperada do composto de interesse [97].

Segundo a Comunidade Européia [109] os intervalos aceitáveis para recuperação em análises de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Contudo, em função da complexidade da composição da amostra esta faixa de variação pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 35\%$.

No estudo de recuperação também são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de *Student* de acordo com a equação 3. Se o valor “t” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato.

$$t_{calc} = \frac{(Rec - 100)}{s_{rec} / \sqrt{(n-1)}} \quad (3)$$

Onde: Rec é a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 é a recuperação percentual desejada; n é o número de determinações (em geral, um mínimo de 5 repetições); s_{rec} é o desvio padrão nas recuperações.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual para a determinação do limite de detecção, pelo método da relação sinal/ruído e por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica [97].

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração detectável em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas; S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*).

4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas [97]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [103].

A determinação do valor do limite de quantificação do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a validação dos resultados, tornando o método menos preciso [110]. Concentrações maiores para o limite de quantificação deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão [96].

O limite de quantificação também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o limite de detecção, sendo que para o limite de quantificação a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e, a equação utilizada é demonstrada na equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

5. MATERIAIS E MÉTODO



5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do método para a determinação de sulfonamidas em amostras de mel cinco etapas foram planejadas. A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a revisão bibliográfica sobre a ocorrência de sulfonamidas em alimentos e mel de forma a reunir dados científicos e literatura para oferecer suporte no desenvolvimento do método. A segunda etapa consistiu no estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas para a análise quantitativa. Uma vez otimizados os parâmetros cromatográficos estes foram fixados e em seguida foram obtidas curvas analíticas dos compostos. Na terceira etapa foi feito um estudo de pré-tratamento da amostra utilizando hidrólise ácida e também foram estabelecidas e otimizadas as condições de extração em fase sólida. As amostras usadas nesta etapa foram às coletadas na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA. Na quarta etapa procedeu-se à validação do método proposto. A última etapa foi realizada pela aplicação do método, utilizando-se amostras de méis comerciais coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins.

5.1.1 Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas

As amostras de mel foram coletadas no apiário Turimel, localizado na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA que está localizada na região do Alto Turu, no estado do Maranhão, às margens da BR 316. A área total do município é de 904, 95 km², localizando-se próximo à fronteira do Estado do Pará, a 420 quilômetros da capital do Maranhão, São Luís.

Segundo apicultores do local a flora comumente visitada pelas abelhas da região inclui as seguintes plantas (nomes populares): chanana, assa-peixe, vassourinha de botão, hortelãzinho, bamburral, juçara, embaúba, maria-mole, cajueiro, laranjeira e seringueira.



Figura 10 – Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.

Fonte: adaptado de [111]

A coleta das amostras para o desenvolvimento do método foi realizada no mês de setembro de 2007. O critério estabelecido para a coleta das amostras a serem utilizadas para o desenvolvimento do método foi a ausência de resíduos de fármacos e outros resíduos de contaminantes. Optou-se por fazer a coleta neste apiário após análise do histórico produtivo do apiário, onde se evidenciou a preocupação com a qualidade do produto. O apiário, atualmente, está buscando certificação orgânica, fato este que serve como indício de que o mel produzido neste apiário seja livre de resíduos de contaminantes.

Foram coletados 30 kg de mel e estes foram armazenadas em frascos de vidro envoltos por papel alumínio a fim de evitar degradação de alguns compostos por ação da luz. Outro cuidado tomado com as amostras foi manter uma vedação dos frascos eficiente, visando impedir a entrada de ar e início de possíveis processos fermentativos. As amostras foram conservadas a temperatura ambiente.

Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para o início das atividades de pesquisa.



Figura 11 - (a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.

5.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram:

5.2.1 Padrões

- Sulfadiazina (SDZ) – Sigma Aldrich, com pureza de $\geq 99\%$;
- Sulfadimetoxina (SDM) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%;
- Sulfadimidina (SDD) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%;
- Sulfatiazol (STZ) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%.

5.2.2 Reagentes e Solventes

- Metanol (HPLC solvent Merck-Germany);
- Acetonitrila (HPLC solvent Merck-Germany);
- Água ultra pura (Milli-Q), sistema Millipore;
- Acetato de Sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) M.M. 136,09 - Merck-Germany ;
- Ácido Acético Glacial P.A. (CH_3COOH)- M.M 60,05 - Merck-Germany.

5.2.3 Dispositivos para Extração por Fase Sólida

- Octadecil silano (C_{18}): cartucho - C_{18} – 500 mg/6mL – AccuBON^{II}ODS – Agilent Technologies;

- Octil silano (C₈): cartucho - Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- Cartucho: ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian.

5.2.4 Coluna Cromatográfica

- Coluna cromatográfica analítica - Phenomenex – 150mm x 4,0 µm d.i, recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica.
- Coluna de Guarda para coluna C-18 – Phenomenex, KJ0-4282.
- Coluna cromatográfica analítica C₈ - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb-Varian.

5.2.5 Equipamentos

- Balança eletrônica, modelo Bel Mark 210A, faixa de pesagem de 10mg-210g – Bell Engineering, Italy;
- Banho ultra-som USC 1450 – Unique Thorton, Brasil;
- Bomba de vácuo – Marconi, modelo MA058, Brasil;
- Cromatógrafo a Líquido marca Varian (EUA), composto por:
 - Bombas de alta pressão - binária - Varian Polaris ProStar 210/210;
 - Injetor manual, loop 20µL - Rheodyne;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, Varian Polaris ProStar 335 – Varian (EUA);
 - Computador Digital, Intel Core 2, 2,4 GHz, HD 160 Gb, com impressora HP Deskjet D 4160;
- Deionizador de água – Milli-Q Academic System – A10, sistema Millipore (EUA);
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian (EUA);
- Rotaevaporador – Fisatom – Brasil, modelo 802;
- pHmetro Hanna Instruments, com eletrodo de pH HI 1110B (vidro combinado) modelo pH 21, Brasil;

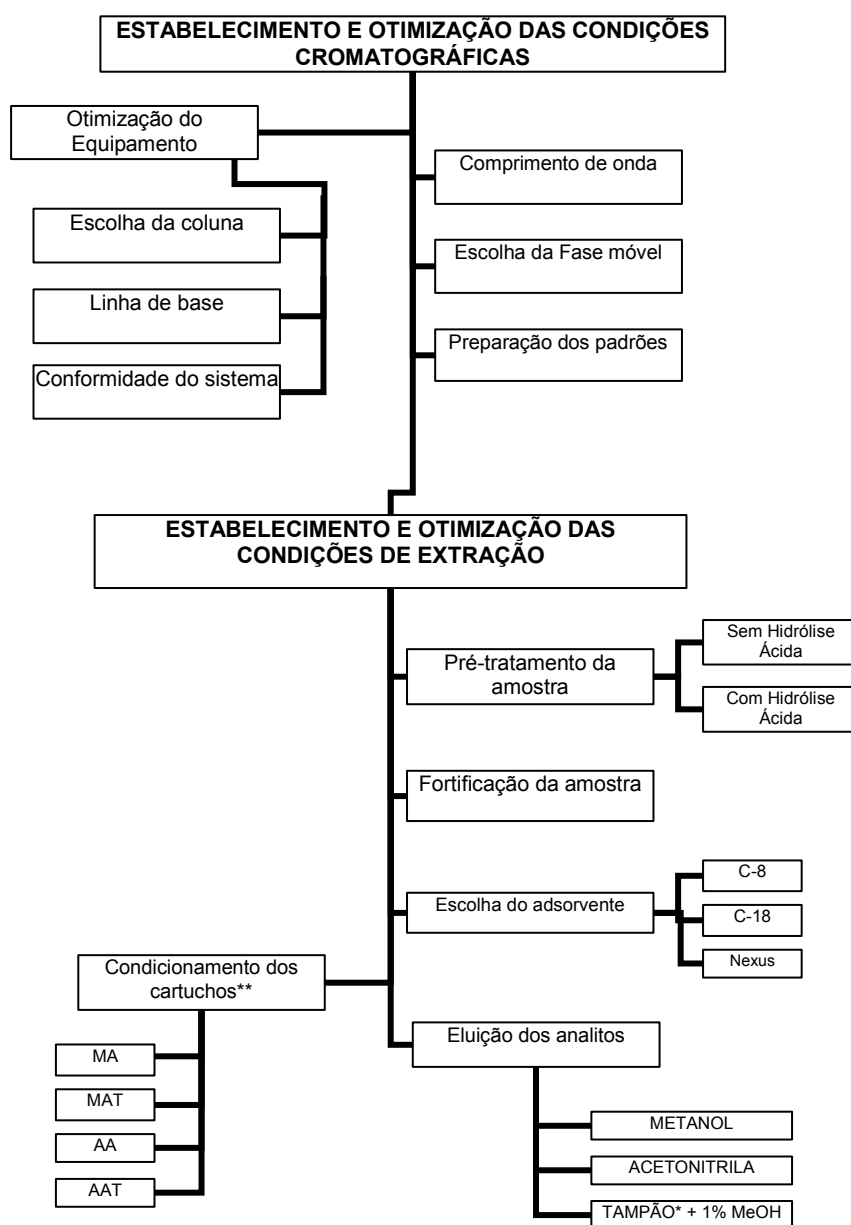
5.2.6 Outros materiais

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0 e 1000,0 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 10 e 100 mL;
- Espátula de aço inox;
- Membrana Acetato de celulose, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - SartoriusMerck;
- Membrana de Vidro, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - Merck
- Detergente Extran – Merck;
- Outros materiais de laboratório (Becker, proveta, micro pipetadores (100-1000 µL e 10-100 µL), funil de separação, pipeta, pipeta de *Pasteur*);
- Sistema de extração a vácuo (*manifold*), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (EUA).
- Gás nitrogênio (N₂) – *White Martins* (Brasil);

5.3 MÉTODO

Os métodos de análises de resíduos de sulfonamidas são desenvolvidos para atender as análises de analitos individuais e análise simultânea de vários resíduos, denominadas “análise multiresíduo”. O desenvolvimento de métodos multiresiduais, em geral, são muito trabalhosos, uma vez que são determinados analitos com características diferentes sofrendo também interferência dos constituintes da matriz que normalmente interferem na análise.

A Figura 12 mostra um fluxograma com a visão geral das etapas do procedimento analítico para o estabelecimento das condições cromatográficas e condições para as extrações.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

** MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.

Figura 12 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.

5.3.1 Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas

A primeira etapa para o estabelecimento das condições cromatográficas consistiu na otimização do equipamento, onde foram realizados os experimentos para escolha da coluna, linha de base e conformidade do sistema (de acordo com os critérios citados por SHABIR,

[113]). O estudo das condições cromatográficas compreendeu seleção do comprimento de onda, escolha da composição da fase móvel e solvente para preparação das soluções-padrão.

5.3.1.1 Seleção da coluna

Para a análise das sulfonamidas foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octilsilano C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb -Varian) e a outra contendo uma fase estacionária octadecilsilano C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm - Phenomenex).

5.3.1.2 Linha de Base do Solvente

É o sinal obtido pelo sistema cromatográfico detector DAD, mais a coluna utilizada com a injeção do solvente. O sinal da linha de base foi obtido injetando-se 20 µL de metanol, um dos solventes a ser utilizado nos procedimentos de desenvolvimento e validação do método. Este teste também forneceu informações sobre o grau de pureza do mesmo, que deve ser grau resíduo (CLAE), necessário para análise de traços de fármacos, com um mínimo de impurezas possível.

5.3.1.3 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada na etapa de otimização do equipamento, assim como no desenvolvimento e validação do método. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção (k'), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critérios de aceitação foram utilizados os parâmetros recomendados por Shabir [113], conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Limites
Fator de retenção (k')	$1 < k' < 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$
Número de pratos teóricos da coluna sendo usada (N)	$N/m > 8000$

Fonte: adaptado de [113].

5.3.1.4 Seleção do Comprimento de onda

Foram realizados dois testes para obtenção dos espectros de absorção, um utilizando espectrofotômetro modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) e outro usando o próprio detector do cromatógrafo (ProStar 335 - Varian). Os espectros de absorção obtidos no espectrofotômetro corresponderam a uma varredura de 190 a 300 nm e a varredura feita no detector do cromatógrafo correspondeu a 250 a 280 nm. O comprimento de onda correspondente à absorbância média dos analitos foi posteriormente utilizado para a determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos.

5.3.1.5 Seleção da fase móvel

Para a análise cromatográfica (CLAE) dos analitos foram testados seis tipos de fases móveis, no modo gradiente.

O preparo dos solventes para a fase móvel consistiu na filtração em kit para filtração com membrana de porosidade 0,45 µm para solventes, orgânicos e água, e desgaseificação em banho ultra-som por 20 minutos para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em garrafas próprias para solventes e foram rotuladas com informações a respeito da sua composição e o valor do pH. Antes do início dos trabalhos as soluções permaneceram no banho ultra-som por 10 minutos para a retirada de gases dissolvidos.

5.3.1.6 Preparação dos padrões

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas, individualmente, pela dissolução dos padrões em metanol. Pesou-se em balança analítica 0,0010g da sulfonamida e solubilizou-se cada uma em metanol, completando-se o balão para 0,01 L de solução. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar rotulado e com tampa de rosca para ser estocado. As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4°C, para evitar degradação dos padrões.

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o teste a ser realizado. Foram utilizados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho: solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 4,5 e solução aquosa de ácido acético 0,1%. As soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações e usadas para fortificação das amostras e para preparo das soluções padrão em extrato para os testes de recuperação e linearidade.

Os padrões foram injetados individualmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após conhecido o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos (solução contendo uma mistura dos quatro padrões – solução mix, a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

5.3.2 Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração

Os métodos de análises cromatográficas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. A etapa de extração em geral é o ponto crítico da análise, por ser responsável por erros nos resultados. As etapas de estabelecimento e otimização das condições de extração consistiram no pré-tratamento da amostra (hidrólise ácida), escolha do adsorvente (C8, C18 e Nexus), condicionamento dos cartuchos (metanol:água; metanol:água:tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5); acetonitrila:água; acetonitrila:água: tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5) e escolha do solvente para eluição (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 com adição de 1% de metanol).

5.3.2.1 Pré-tratamento da amostra

O mel é uma amostra complexa composta por várias substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes. Para diminuir o efeito da matriz na análise cromatográfica alguns trabalhos na literatura sugerem uma etapa de hidrólise ácida antes da extração a fim de romper possíveis ligações de interferentes com os analitos de interesse.

No presente trabalho, foram realizados vários testes para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. A massa de mel foi fixada em 1,0 g, de forma a diminuir o número de variáveis a serem testadas. Os parâmetros estudados

foram: concentração do ácido, volume de ácido a adicionar, tempo de hidrólise e forma de agitação. Na Tabela 5 são apresentados os testes realizados.

Tabela 5 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

A etapa de hidrólise ácida propriamente dita consistiu na adição de um volume de ácido em 1,0 g de mel. A solução de mel (extrato) foi levada para agitação por um determinado tempo. Após a hidrólise ácida os extratos hidrolisados de mel tiveram seu pH ajustado para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e solução tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5. Os extratos de mel após ajuste do pH foram filtrados em membrana de filtração (membrana de acetato de celulose) para retirada de quaisquer partículas que possam estar presentes no extrato.

5.3.2.2 Seleção do adsorvente

Visando obter uma melhor recuperação do analito, três adsorventes foram avaliados, sendo eles:

- EFS Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- EFS ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian;
- EFS C₁₈ – 500 mg/6mL – AccuBOND^{II}ODS – Agilent Technologies.

5.3.2.3 Condicionamento dos cartuchos

Os solventes testados para o condicionamento do cartucho e suas proporções foram:

metanol:água (1:1); metanol:água:tampão (1:1:1); acetonitrila:água (1:1); e acetonitrila:água:tampão (1:1:1).

5.3.2.4 Eluição dos analitos

Para verificar a melhor condição de extração das sulfonamidas foram testados três solventes para eluição, sendo eles: metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5 com adição de 1% metanol.

5.3.2.5 Extração por EFS

A fortificação das amostras para os estudos de extração consistiu na adição de volumes de solução padrão dos analitos no mel, de forma que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 µL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L⁻¹.

Os cálculos realizados foram realizados do seguinte modo: para se obter a concentração de 0,10 mg L⁻¹ das quatro sulfonamidas em 1000 µL de solução final, por exemplo, necessita-se de $10 \times 10^{-3} \text{ mg}$ $\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1} \right)$.

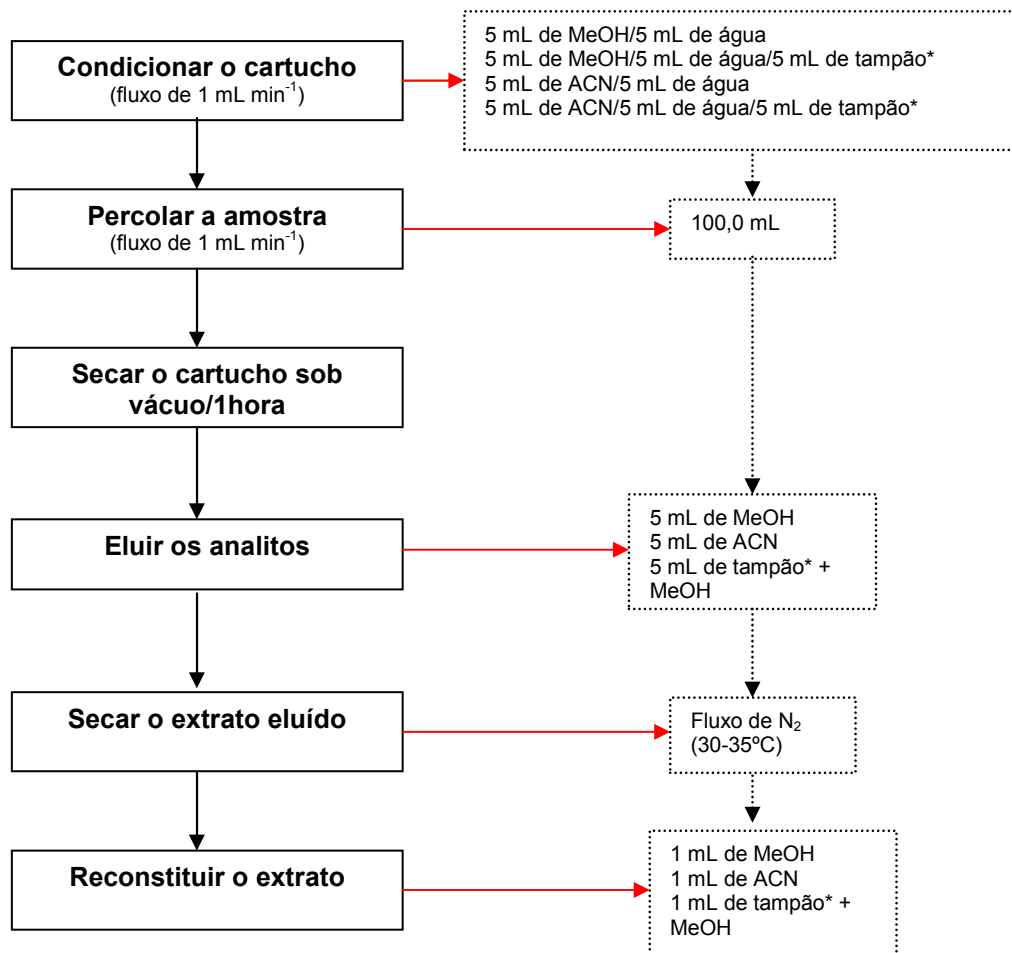
Como foi percolado um volume de 100,0 mL de extrato de mel hidrolisado enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 0,10 mg L⁻¹

$\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow C = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ mg}}{100 \times 10^{-3} \text{ L}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \right)$. Partindo-se de uma solução estoque de 1,0 mg L⁻¹,

o volume da solução padrão mista a ser adicionado no extrato de mel é de 10 mL $\left(C_{\text{padrão}} \cdot V_{\text{padrão}} = C_{\text{amostra}} \cdot V_{\text{amostra}} \rightarrow 1,0 \text{ mg L}^{-1} \times V_{\text{padrão}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 100 \text{ mL} \rightarrow V_{\text{padrão}} = 10 \text{ mL} \right)$.

Para a extração das amostras, testemunha e fortificada, foram realizadas utilizando-se sistema de extração (Manifold) sob vácuo. Antes da percolagem da amostra através do cartucho este foi condicionado com solventes, vazão de fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0 mL da amostra (fluxo de 1 mL min⁻¹), os cartuchos foram secos sob vácuo por 45 minutos. Procedeu-se a eluição dos analitos com 5 mL de solvente, em seguida os analitos eluídos foram secos sob N₂ a temperatura ambiente e posteriormente retomados com 1000 µL de solvente. Os extratos foram em seguida injetados para análise cromatográfica.

A Figura 13 mostra um esquema com as etapas do procedimento analítico para os testes de extração para determinação de sulfonamidas em mel.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

Figura 13 - Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração EFS.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA [60] e Comunidade

Européia (*EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE*) [109] para análise de resíduos em alimentos.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se testes em quintuplicata, de padrões e amostras testemunhas, com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada sulfonamida.

5.4.2 Linearidade

A região linear de resposta do detector foi determinada através de cálculo de regressão linear da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções-padrão assim como com amostras testemunhas fortificadas nas mesmas concentrações que as soluções-padrão. As soluções foram preparadas a partir de uma solução intermediária de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram injetadas cinco vezes. As concentrações utilizadas para o estudo das sulfonamidas foram: 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa linear de trabalho). Construiu-se o gráfico de calibração para os compostos estudados, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo x e os valores das áreas dos picos no eixo y.

A linearidade e a sensibilidade do método foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica. A linearidade foi expressa como o coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

5.4.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O Limite de detecção (LD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas. Para isso, foram estabelecidas as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. O Limite de quantificação (LQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas.

Determinou-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse para calcular os limites de detecção e de quantificação.

5.4.4 Estudo de recuperação

Os estudos de recuperação foram utilizados para avaliar o método quanto à precisão e exatidão; este foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 5.5).

O procedimento experimental consistiu da adição de volumes da solução padrão no mel, para que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 μL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L^{-1} .

5.4.4.1 Precisão

Foram realizados dois testes quanto à precisão do método. Verificou-se a precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de duas amostras de mel fortificadas a concentração de 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, os testes foram realizados em quintuplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Já a precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de duas amostras de mel em 3 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 25, 50 e 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

5.4.4.2 Exatidão

Os resultados e as conclusões com os dados obtidos do método analítico foram submetidos à avaliação estatística, e a expressão dos resultados foi apresentada em um determinado intervalo de confiança relacionado com os valores de exatidão e precisão dos resultados. Aplicou-se o teste “t” *de Student* nos resultados.

5.5 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras comerciais de mel, coletadas no Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (estados vizinhos ao Maranhão). Na Figura 14 é apresentado um esquema com o método proposto para a determinação de sulfonamidas em mel.

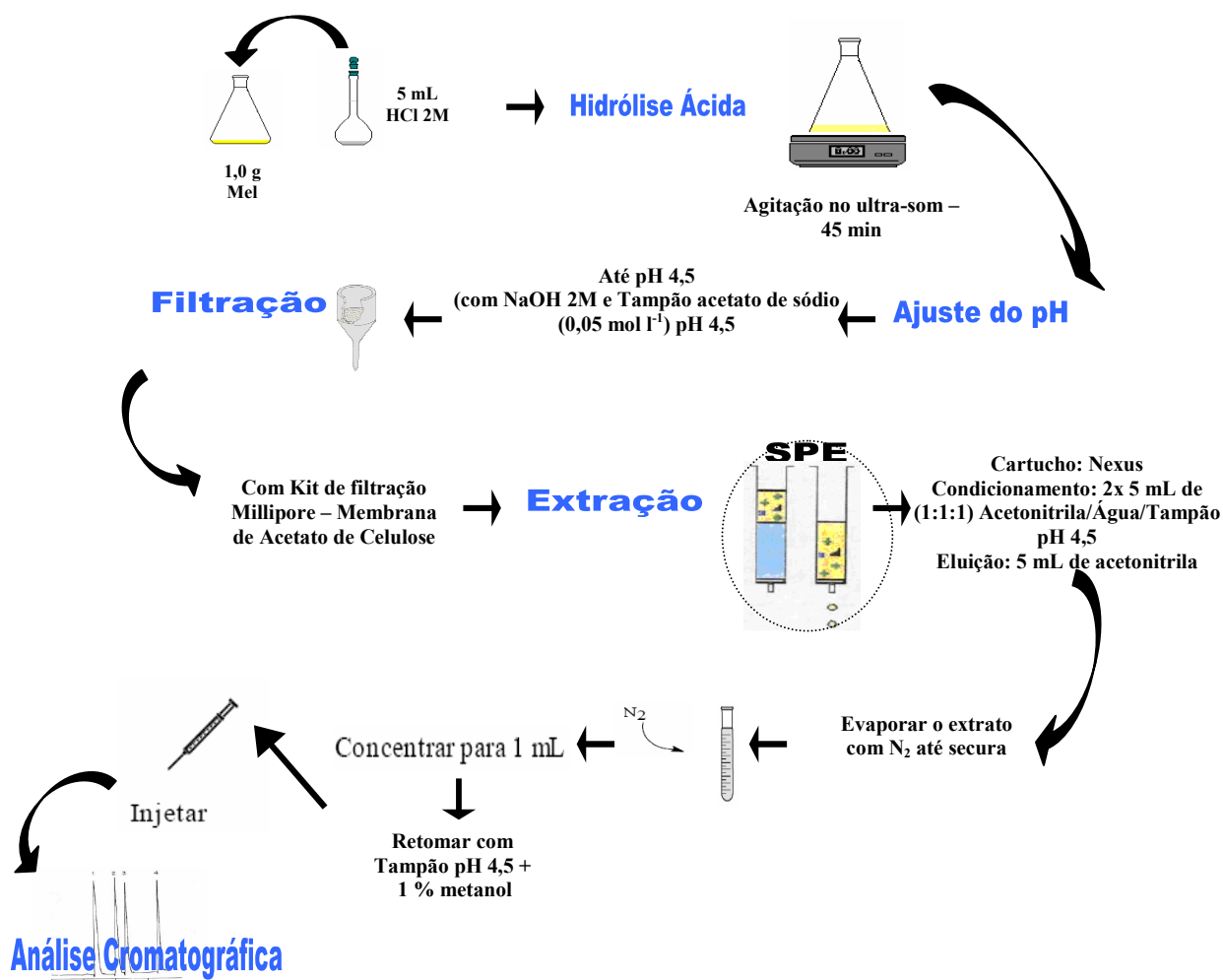


Figura 14 - Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por ZOTOU e VASILIAOUDOU [11] para a determinação de sulfonamidas em mel por HPLC-DAD que emprega solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6; como fase estacionária a coluna C18 e fase móvel: metanol e solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6, com adição de 1% de ácido acético, no modo isocrático. Os autores realizaram testes de extração em fase sólida com vários cartuchos e solventes para eluição. Para a etapa de extração foi utilizado o método recomendado por MAUDENS *et al.* [63] como referência inicial, que utilizou hidrólise ácida com ácido clorídrico 2M e extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C18.

6.1 SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Na Tabela 6 são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 300 nm para as sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram posteriormente selecionados na determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos. Os testes foram realizados com as sulfonamidas com concentração em 1 mg L⁻¹ em metanol.

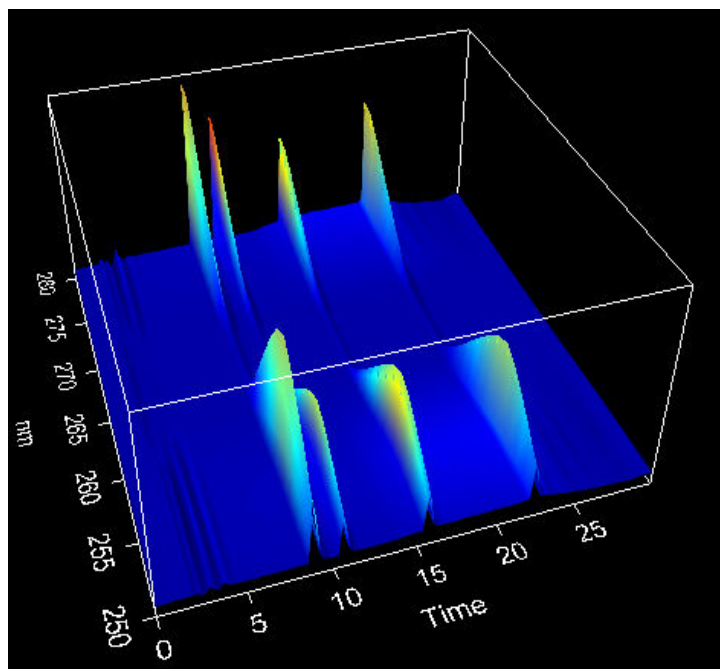
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.

Composto	λ máx (nm)
Sulfadiazina	270
Sulfadimetoxina	272
Sulfadimidina	269
Sulfatiazol	260

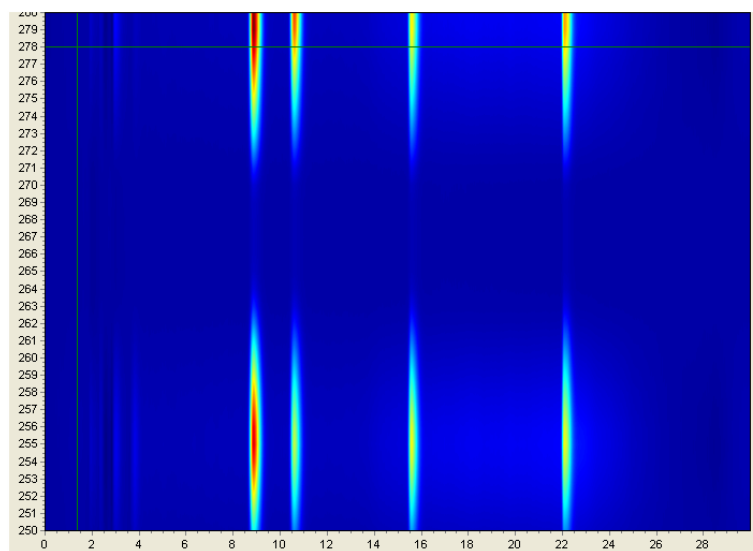
Nas Figuras 15 (a e b) e 16 (a e b) são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção na região do UV (250-280 nm) e os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda na região UV em estudo.

Os resultados encontrados em ambos os equipamentos confirmam o comprimento de onda de máxima absorção, 278 nm, para a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e

sulfadimetoxina. Para sulfatiazol, embora a máxima absorção não ocorra em 278 nm, resultados satisfatórios foram obtidos neste comprimento de onda, justificando a escolha deste comprimento de onda para os quatro compostos em estudo.

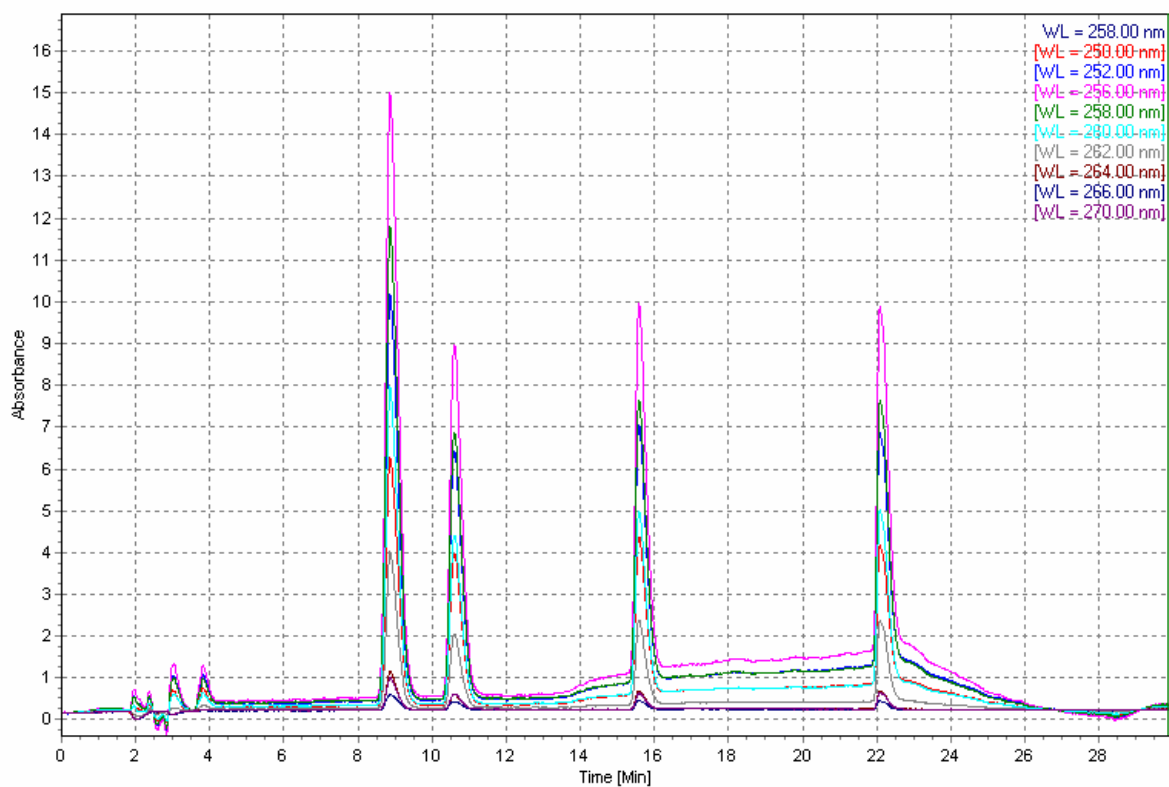


(a)

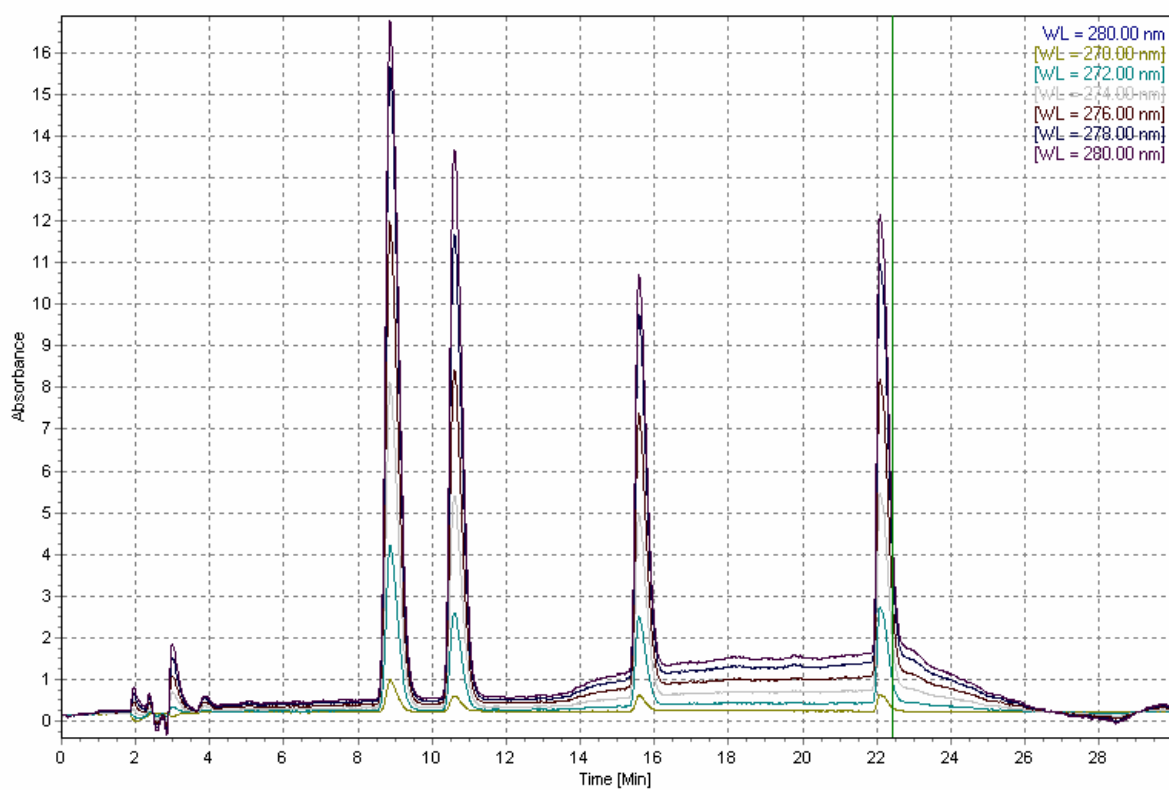


(b)

Figura 15 - Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.



(a)



(b)

Figura 16 - Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatográfico: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm

6.2 SELEÇÃO DA COLUNA

Para se obter uma melhor separação cromatográfica foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas duas colunas analíticas, uma com fase C_8 (mais polar), e com uma coluna C_{18} (menos polar). Com ambas as colunas obteve-se uma boa resolução e boa separação dos compostos de interesse. A Figura 17 mostra uma sobreposição dos cromatogramas resultantes da injeção da mistura dos padrões em concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Selecionou-se a coluna C_{18} em função dos maiores valores de áreas dos picos das sulfonamidas, confirmando-se os dados encontrados na literatura que citam maior utilização da coluna C_{18} .

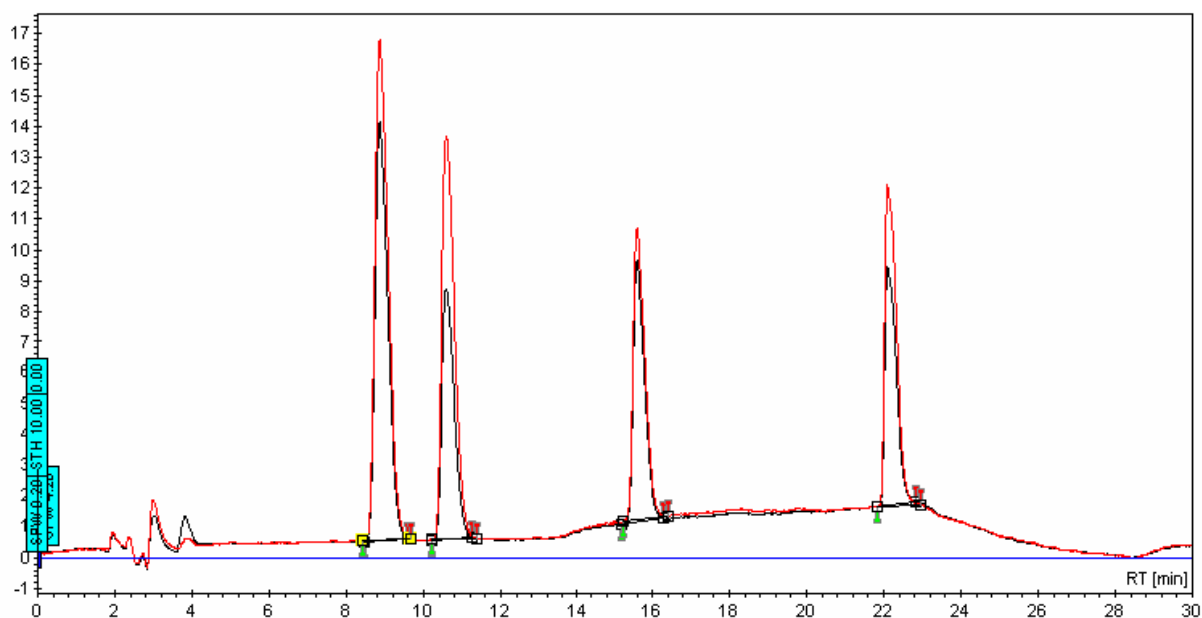


Figura 17 - Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando C_{18} (cromatograma vermelho), C_8 (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).

6.3 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é muito importante na separação dos analitos devido à interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a proporcionar uma resolução adequada dos analitos, boa separação, menores tempos de

retenção, mantendo, entretanto, a solubilidade dos analitos no decorrer da separação cromatográfica e, principalmente, sem interferir na detecção dos analitos de interesse.

6.3.1 Seleção do pH da fase móvel

As sulfonamidas estudadas apresentam caráter anfótero (solubilidade entre 1 e 192 mg/100mL de água a 27°C) e valores de pK_a entre 6,21 e 7,45. Vários trabalhos na literatura apontam o uso de solução-tampão de acetato de sódio (pH 4,5) na fase móvel, justificando que seu uso mantém as espécies iônicas estáveis no decorrer das análises. A escolha do pH da solução-tampão constitui-se, então, em um fator importante. Foram feitos testes para verificar em qual pH as sulfonamidas estudadas teriam a melhor resposta no detector DAD. Os valores de pH testados foram: 3,5; 4,5 e 5,5, como apresentado na Figura 18. Para a realização dos testes de pH utilizou-se acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Em todos os valores de pH obteve-se boa separação e resolução. Entretanto, em pH 4,5 melhores resultados foram obtidos, quando se comparando as áreas dos picos nos três valores de pH.

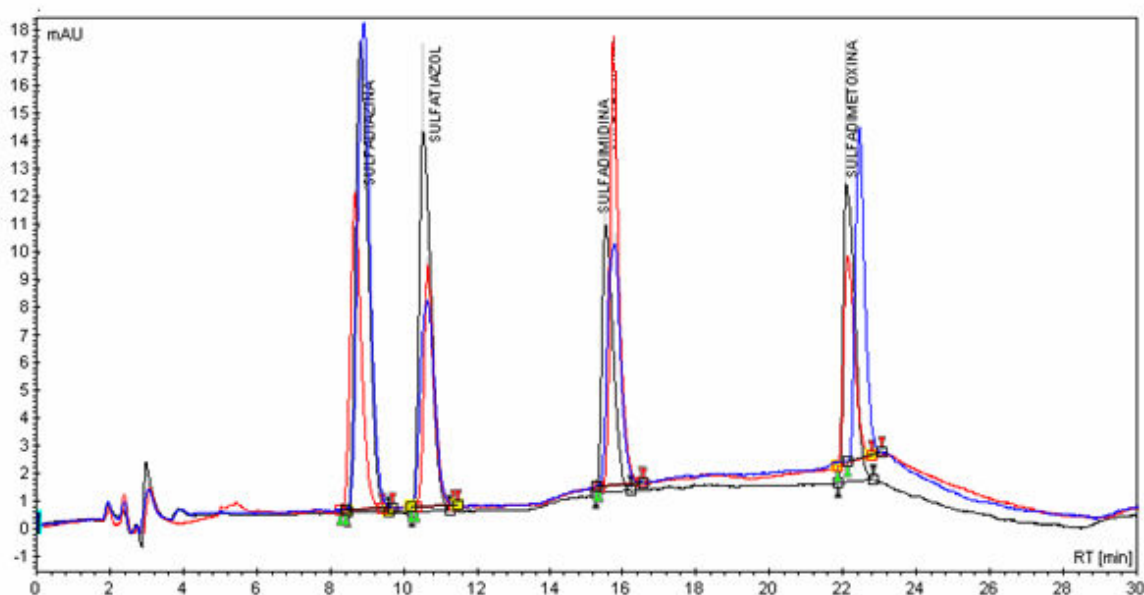


Figura 18 - Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto)

6.3.2 Composição da fase móvel

No Quadro 4 são apresentados os testes realizados no estudo da composição da fase móvel.

Teste	Gradiente			Composição da Fase móvel	
	t (min)	%	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
Teste 1	0	10:90	1,0	Metanol	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 2	0	10:90	1,0	Metanol	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 3	0	10:90	1,0	Metanol	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 4	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 5	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 6	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			

*t – tempo em minutos; % - proporção de solvente

Quadro 4 - Testes para seleção da composição da fase móvel

Quando metanol foi empregado na fase móvel, independente da composição da fase aquosa, não foi possível observar todos os picos das sulfonamidas injetadas. Em todos os

testes em que foi utilizado este solvente, observou-se somente os picos da sulfadiazina, sulfatiazol e sulfadimidina, não sendo identificando sinal para sulfadimetoxina. Este fato pode ser explicado em função do poder de arraste do metanol, que não deve ter sido suficiente para detectá-la nas condições estabelecidas. Os resultados dos testes feitos com tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e solução de ácido acético 0,1% apresentaram áreas dos picos maiores que as obtidas quando utilizando água na fase móvel. Na Tabela 7 são apresentados a quantidade e os respectivos compostos separados no estudo da composição da fase móvel. Os cromatogramas típicos obtidos com os melhores resultados para cada teste de composição da fase móvel são apresentados nas Figuras 19, a e b.

Para os testes empregando-se acetonitrila, melhores resultados foram encontrados para todas as composições da fase móvel. Utilizando-se ACN: solução de ácido acético 0,1% e ACN: tampão acetato de sódio pH 4,5, resolução e separação adequadas foram observadas para as quatro sulfonamidas. Acetonitrila e água apresentaram melhores resultados sendo, assim, selecionados como os solventes adequados para a fase móvel (Figura 19 - b).

No ANEXO 03, são apresentados todos os cromatogramas dos testes realizados nos estudos da composição da fase móvel.

Tabela 7 – Estudo da composição da fase móvel.

Teste	Quantidade de compostos separados	Compostos separados
01 (MeOH:H ₂ O)	03	SDZ, STZ, SDD
02 (MeOH:TAMPÃO)	03	SDZ, STZ, SDD
03 (MeOH:ÁGUA ÁC 0,1%)	03	SDZ, STZ, SDD
04 (ACN:H ₂ O)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
05 (ACN:TAMPÃO)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
06 (ACN: ÁGUA ÁC 0,1%)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM

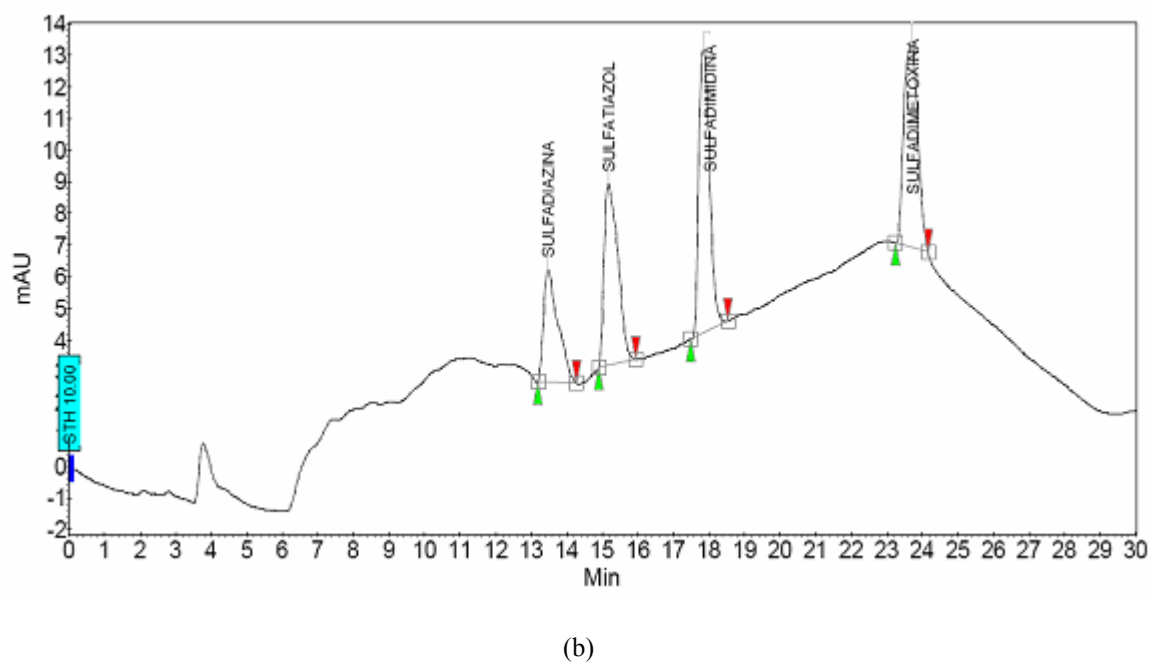
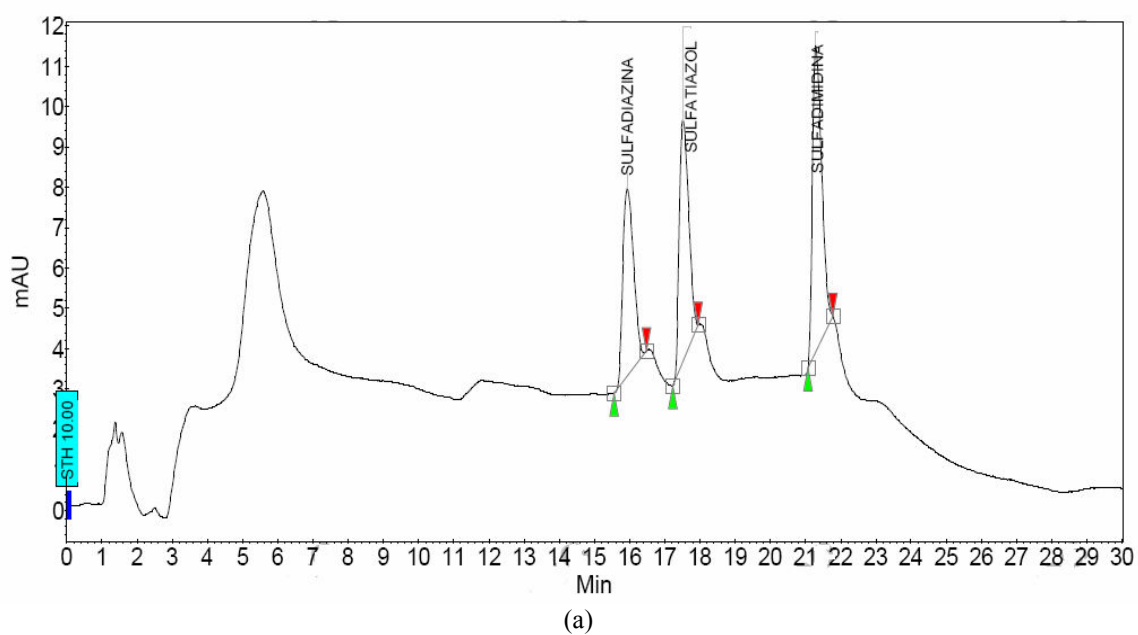


Figura 19 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água

6.3.3 Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho

As sulfonamidas são compostos ligeiramente solúveis em água, e apresentam maior solubilidade em soluções ácidas ou básicas e em solventes orgânicos [9]. Segundo Sun *et al.* [9], a solução de ácido acético 0,1% quando utilizada como solvente para as soluções de trabalho, proporciona picos cromatográficos mais definidos. Para Pecorelli *et al* [18], as soluções de trabalho devem ser preparadas usando-se solução tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, uma vez que favorecem a estabilidade das sulfonamidas.

Para se obter resolução e separação cromatográfica adequadas foram testados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho. Dois testes foram realizados, utilizando-se solução-tampão de acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e utilizando-se solução de ácido acético 0,1%. Para ambos os solventes foram obtidos resultados satisfatórios, entretanto, a solução tampão (Figura 20) forneceu maiores áreas dos picos cromatográficos, tendo-se optado por este solvente para a realização das demais análises.

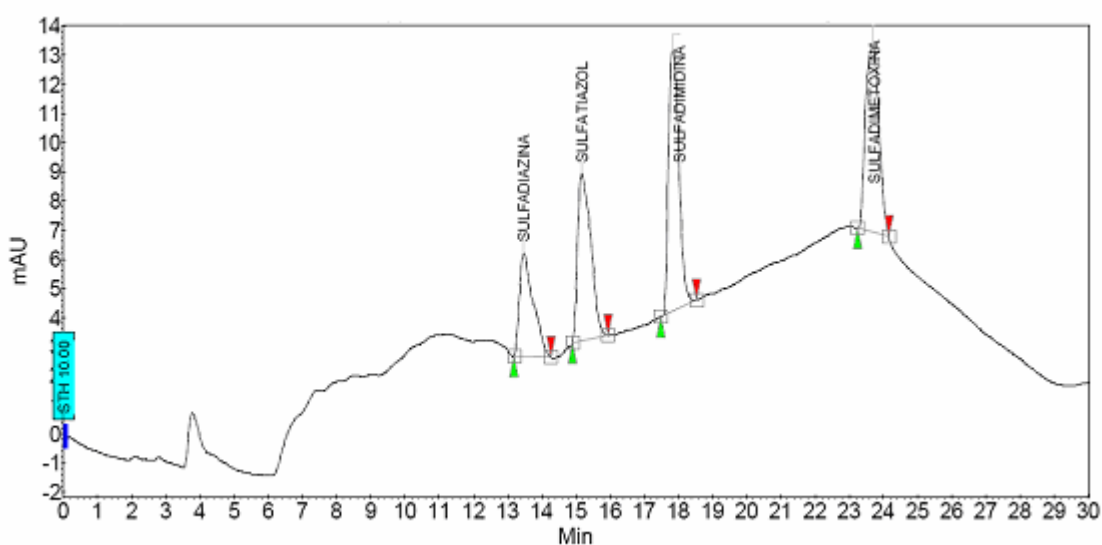


Figura 20 - Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5.

Outro teste realizado foi a otimização do tempo de análise. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação e a resolução dos picos, o fluxo da fase móvel foi variado de $0,4$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados demonstraram que quanto menor o fluxo da fase móvel sulfadiazina e sulfatiazol apresentam tempos de retenção bem próximos dificultando a

separação dos picos. Em fluxos maiores ocorre uma melhor separação. O fluxo de 1 mL min⁻¹, apresentou os melhores resultados podendo-se observar separação dos picos satisfatória.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Depois de selecionadas as condições cromatográficas foram realizados cinco repetições em concentração 1,0 mg L⁻¹ para cada sulfonamida, com os melhores resultados dos testes anteriores. Na Tabela 8 são listadas as condições cromatográficas selecionadas. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 8 - Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.

Item	Condições
Equipamento	CLAE-DAD
Coluna	CL-18, 150mm x 4,6mm, 4µm - Phenomenex
Coluna de Guarda	KJO-4282 – Phenomenex
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Água
Proporção dos solventes	10:90
(A:B)	15:85
	30:70
	40:60
	15:85
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	278 nm

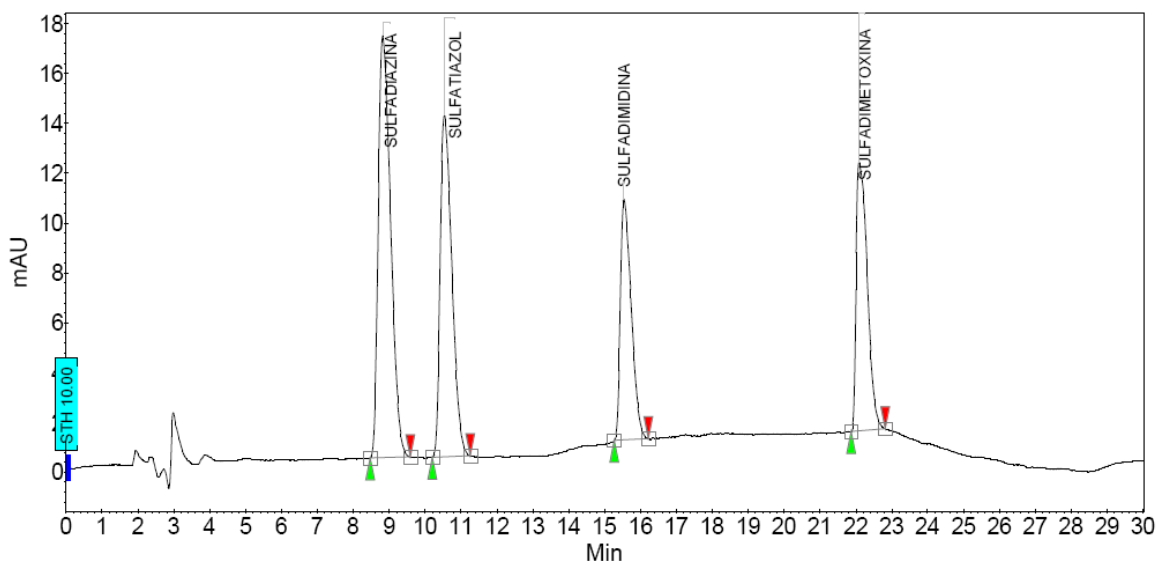


Figura 21 - Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

A estabilidade dos padrões também foi avaliada nesta etapa. A avaliação da estabilidade das soluções intermediárias utilizadas na metodologia analítica foi realizada com o objetivo de verificar a ocorrência de degradação do analito. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos padrões durante a estocagem a -10°C em um período de 3 meses. As amostras foram analisadas após 1 semana, 1, 2 e 3 meses. Definiu-se como critério de aceitação variações menores que 20% em relação à concentração inicial, levando-se em consideração possíveis alterações ocasionadas pelo próprio armazenamento.

Verificou-se que a estabilidade dos padrões é mantida por até 3 meses e 7 dias, após esse período a concentração dos padrões sofre uma perda média do analito de aproximadamente 40 %. A Figura 22 apresenta um gráfico com a percentagem de degradação das soluções-padrão.

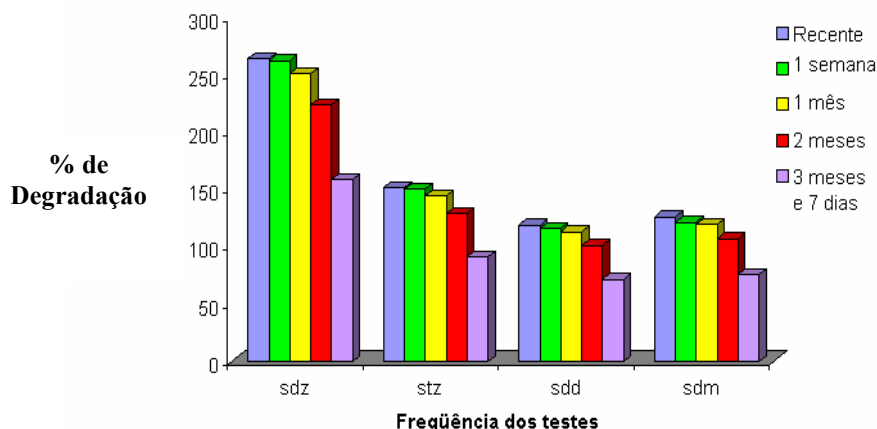


Figura 22- Estudo da degradação das soluções-padrão

6.5 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS

A metodologia de extração utilizada neste trabalho baseou-se em estudos de; SUN *et al.* [9]; BISWAS *et al.* [71]; WANG *et al.* [67]; ZOTOU e VASILADOU [11]; MAUDENS, ZHANG E LAMBERT [63]; PECORELLI *et al.* [18]; MARTEL e ZEGANNE [64]; PANG *et al.* [65]; CANCHO-GRANDE *et al.* [116]; FURUSAWA [14]; STOEV & MICHAILOVA [80]; VIÑAZ *et al.* [86]; HORIE *et al.* [66].

Os testes foram realizados utilizando-se extrato de mel, preparado pela diluição de 1,0 g de mel em água + solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (amostra sem hidrólise ácida) e extrato hidrolisado de mel (1,0 g de mel + solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}). Foram utilizados volumes de 100,0 mL de amostras fortificadas com as sulfonamidas de interesse. Para os testes preliminares utilizou-se nível de fortificação de 50 ng g^{-1} de cada sulfonamida. A extração foi realizada em triplicata e as injeções cromatográficas também foram feitas em triplicata. Avaliou-se a recuperação de cada composto após os procedimentos de extração, comparando-se com a injeção, direta dos padrões das sulfonamidas. Uma vez estabelecidas as condições, novos testes foram realizados, utilizando-se três níveis de fortificação (25 , 50 e 100 ng g^{-1}).

6.5.1 Pré-tratamento da amostra

Em síntese, podemos definir o mel como um produto açucarado, constituído em sua maioria por açúcares. As sulfonamidas têm como característica formarem ligações com açúcares, principalmente ligações com açúcares redutores, podendo formar uma variedade de diferentes compostos açúcar-sulfonamida [114] o que poderia modificar o comportamento dos picos cromatográficos pelo efeito de matriz. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre açúcar e sulfonamida, estudada por Sheth *et al.* [114]. No citado estudo, realizou-se uma reação de uma molécula de sulfatiazol com uma molécula de açúcar redutor, ocorrendo a formação de uma base de Schiff (n-glucosilamina) e liberação de uma molécula de água, formando-se em seguida um composto de Amadori e, após um longo período de armazenamento, o autor comenta a possibilidade de formação de outros produtos da reação de Maillard. O referido autor cita também que sobre condições ácidas a tendência é a formação de sulfonamidas livres devido a ionização do grupo amina. O autor ainda afirma que a ligação de açúcares-sulfatiazol poderá ocorrer com outras sulfonamidas também.

Schwaiger e Schuch [115] estudaram e provaram que para a determinação de sulfonamidas em mel é necessário uma etapa de hidrólise ácida antes da análise cromatográfica para quebrar as ligações açúcar-sulfonamida. Observaram também que após a hidrólise ácida é necessário realizar um ajuste no pH do meio para 4,5 para que as sulfonamidas permaneçam estáveis no meio.

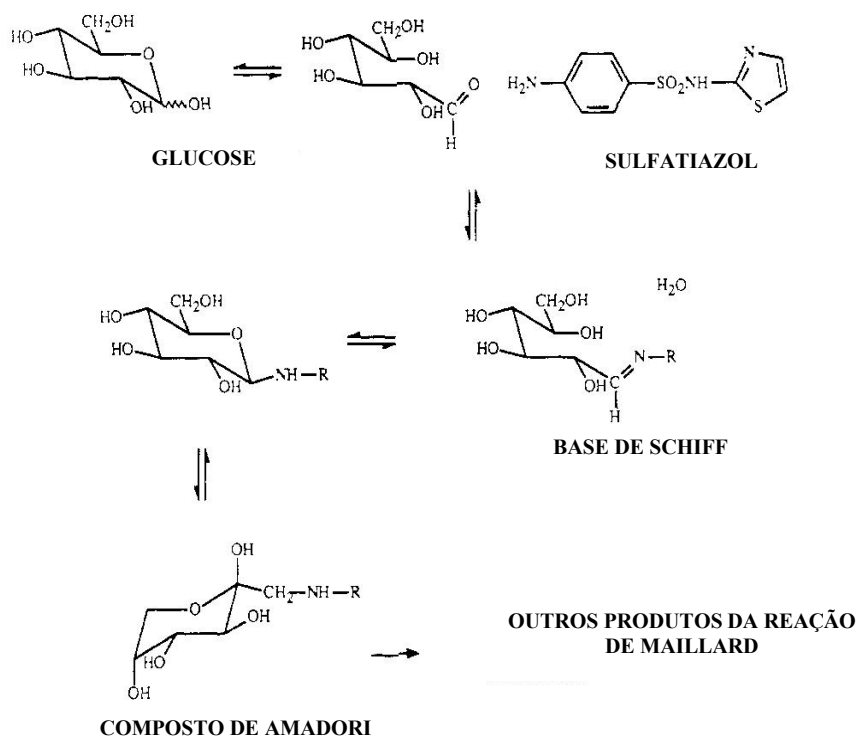


Figura 23 – Esquema da reação açúcar-sulfonamida.
 Fonte: adaptado de [114].

Inicialmente foram realizados testes para selecionar as melhores condições para o pré-tratamento da amostra. Na Tabela 9 são apresentados os testes realizados.

Tabela 9 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

Após definidas as condições para a hidrólise foram realizados dois testes com a matriz. O primeiro consistiu somente na diluição de 1,0 g de mel em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5, neste caso não utilizou-se hidrólise ácida. O segundo teste consistiu na realização de uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico, como descrito na seção 5.3.2.1. Os resultados dos testes de hidrólise mostraram que as variáveis que mais influenciam na eficiência da hidrólise ácida são concentração e volume de ácido adicionado e tempo de agitação. A forma de agitação influencia, mas não como as outras variáveis. A concentração do ácido mostrou ser uma variável muito importante, sendo a concentração de 2M a mais eficiente. O volume de ácido adicionado influencia tanto na dissolução quanto na eficiência da hidrólise. O tempo de agitação também está diretamente ligado à eficiência da hidrólise. O conjunto de condições: concentração de 2M e tempo de 30 minutos, apresentou bons resultados, mas não melhores dos que os apresentados na mesma concentração e tempo de 45 minutos.

Das condições estudadas, os melhores resultados foram os obtidos pelo seguinte conjunto: concentração de 2M, 2 mL de ácido e 45 min. O volume de 2 mL propiciou melhores resultados, no entanto, dificulta a dissolução do mel, tendo-se optado pela adição de volume de 5 mL. A agitação em banho ultra-som foi escolhida por apresentar resultados um pouco melhores do que os encontrados com o uso da mesa agitadora. Nas Figuras 24 - a e b, são apresentados os cromatogramas correspondentes a este teste. Pode-se observar através das Figuras que sem hidrólise do mel ocorreram muitos ruídos, porém a evidência mais importante é que não foram observados os picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas de interesse. Na amostra testemunha fortificada foram observados vários picos interferentes em tempos de retenção próximos aos dos picos das sulfonamidas de interesse. A

ocorrência destes picos cromatográficos pode ocasionar diminuição nas áreas dos picos cromatográficos das sulfonamidas de interesse o que pode levar a resultados errados. Na Figura 24 b é apresentado um cromatograma típico de uma amostra de testemunha fortificada sem passar por uma etapa de hidrólise ácida.

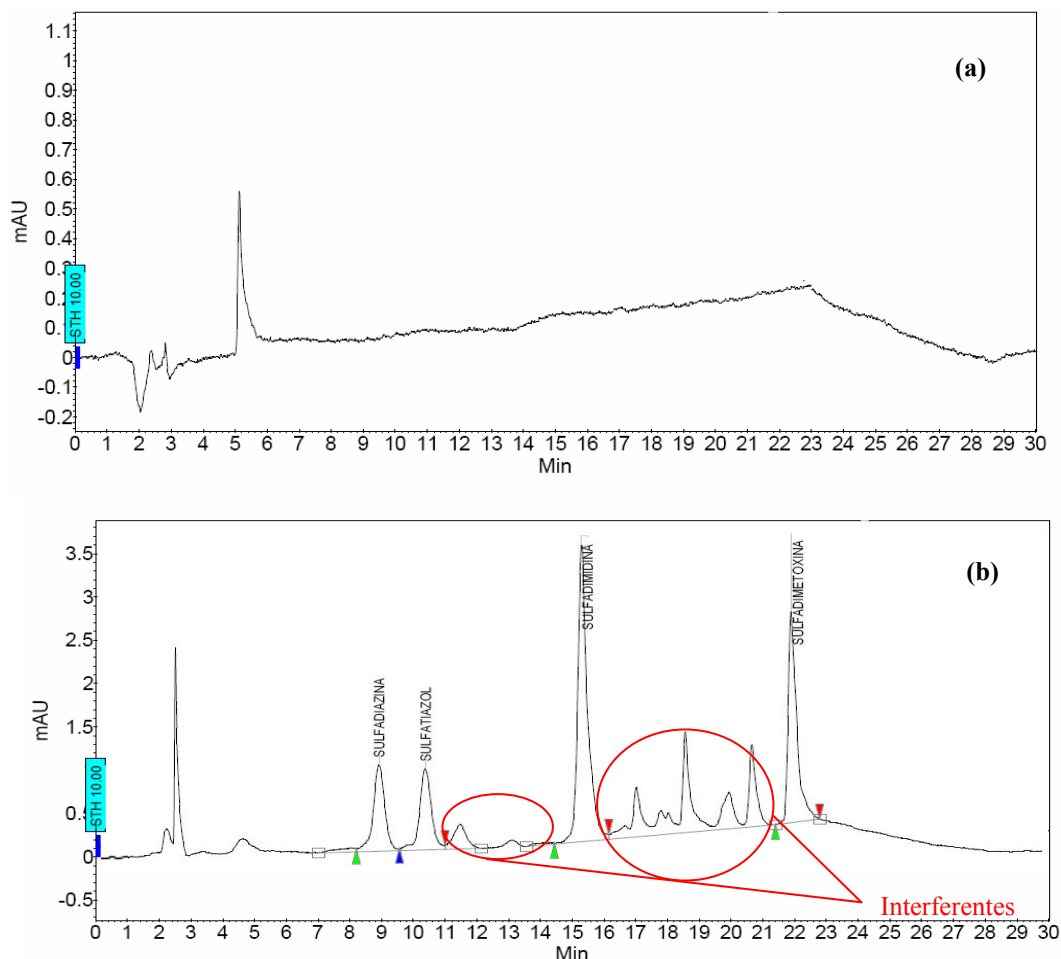


Figura 24 - Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹, sem hidrólise ácida.

De um modo geral, todos os testes de hidrólise mostraram-se etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. Para o mel submetido à etapa de hidrólise ácida, foi possível perceber melhora do ruído no cromatograma, não sendo também observados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Os melhores resultados são mostrados nas Figuras 25 - a e b.

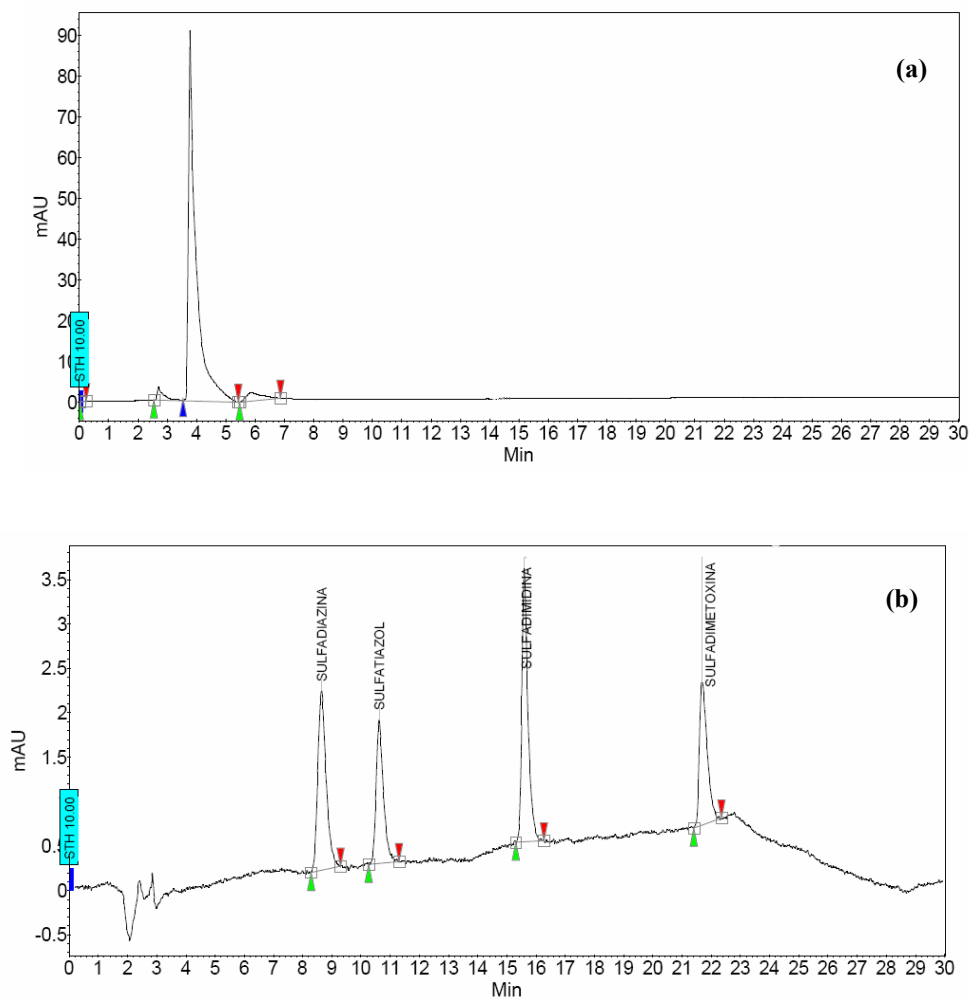


Figura 25 - Cromatogramas obtidos nos testes de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , com hidrólise ácida.

Pode-se evidenciar por este estudo a importância da etapa de hidrólise ácida, observando-se no cromatograma sem hidrólise a presença de vários picos interferentes próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, o que levou a uma redução das áreas dos picos dos compostos. Com a amostra de mel submetida à hidrólise ácida o cromatograma quase não evidenciou interferentes, tendo apresentado separação adequada dos picos das sulfonamidas.

6.5.2 Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração por fase sólida

Os testes realizados para escolha do adsorvente, solvente para condicionamento do cartucho e solvente para eluição tiveram por objetivo escolher o conjunto de condições que oferecessem a melhor eficiência na extração, ou seja, os melhores resultados de recuperação. As recuperações obtidas na extração de compostos nos níveis de concentração estudados deve ser entre 70-120%. As fases e condições utilizadas nas extrações são citadas na Tabela 10.

Cabe mencionar, que a eficiência da extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na amostra de mel fortificada em relação ao analito em solução padrão.

Tabela 10 - Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)

Teste	Cartucho	Condicionamento
Teste 1	C-8	MA/MAT/AA/AAT*
Teste 2	C-18	MA/MAT/AA/AAT
Teste 3	Nexus	MA/MAT/AA/AAT

***MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.**

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos testes de eficiência de extração. Quando metanol foi utilizado como solvente de eluição recuperações inferiores a 70% foram obtidas.

Tabela 11 - Resultados dos testes de eficiência de extração

Analito	Eluente	Eficiência da extração (% de recuperação)											
		C8 (teste 1)				C18 (teste 2)				Nexus (teste 3)			
		MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT
SDZ	MeOH	42	41	49	48	53	64	56	60	57	60	62	65
	ACN	61	67	65	70	66	70	68	73	73	79	80	84
	Tampão	58	62	61	62	67	73	70	76	73	77	79	83
STZ	MeOH	39	45	40	48	55	51	51	56	51	58	56	59
	ACN	56	60	55	65	62	64	63	71	60	67	75	84
	Tampão	51	60	55	60	55	63	66	70	62	66	68	76
SDD	MeOH	42	45	44	47	55	61	64	63	53	60	53	63
	ACN	60	65	62	66	63	68	67	66	72	76	74	79
	Tampão	62	64	63	57	66	72	74	68	64	69	70	78
SDM	MeOH	43	47	42	45	51	59	54	61	55	58	52	61
	ACN	60	63	62	67	70	64	67	63	73	76	66	79
	Tampão	55	58	56	58	72	75	74	78	71	74	78	82

Analisando-se os resultados da Tabela 11, observa-se que os cartuchos Nexus proporcionaram recuperações, de 51 a 65%, em todos os tipos de condicionamento realizados. Para os cartuchos C18, as recuperações variaram entre 51-64%. Com cartucho C8 menores recuperações foram obtidas de 41-49%, supondo-se problemas com a polaridade da fase.

Dos condicionamentos testados, os solventes acetonitrila/água/tampão foram os que apresentaram melhores resultados para todos os cartuchos. A utilização de tampão no condicionamento proporcionou melhores resultados. Os solventes metanol/água foram a sequência que apresentaram menores valores de recuperação.

Para a eluição, verificou-se que, com acetonitrila, as recuperações foram melhores dos que as obtidas quando metanol foi utilizado como solvente de eluição dos analitos. As recuperações encontradas foram de 51-84%. Analisando-se os resultados dos testes utilizando-se acetonitrila como eluente, observou-se que com cartuchos Nexus, melhores recuperações foram também obtidas (60-84%). O cartucho C18 também apresentou resultados satisfatórios (62 a 73%). Para o cartucho C8, menores recuperações (55-70%) foram obtidas.

As extrações utilizando tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹), pH 4,5 e adição de 1% de metanol como eluente para os analitos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com acetonitrila. As recuperações para os cartuchos Nexus foram de 62-83%. Já

para o cartucho C18 foram de 55-79% e para o cartucho C8 as recuperações foram de 51-62%.

Com base nos resultados encontrados, quanto ao material que constitui a fase sólida do cartucho, pode-se observar que o cartucho Nexus apresentou uma maior interação com as moléculas dos analitos dos que as fases sólidas C8 e C18 obtendo-se melhores resultados em todos os testes. Os resultados dos testes realizados com os cartuchos C8 não foram satisfatórios para nenhuma das condições testadas. Pressupõe-se que a polaridade da fase possa ter interferido na extração. E como eluente a acetonitrila apresentou os melhores resultados, incluindo secagem mais rápida sob fluxo suave de nitrogênio.

Objetivando-se promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes também foram realizados dois testes de *clean-up*, ambos utilizando-se cartuchos de *Florisil*, 500 mg/6mL. O primeiro teste (*clean-up* 1) foi realizado com 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila e o segundo teste (*clean-up* 2) foi realizado com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após a passagem das amostras pelos cartuchos de *Florisil*, submeteu-se a fluxo suave de nitrogênio até a secura. As amostras foram retomadas com 1 mL de acetonitrila e injetadas. A Figura 26 apresenta os resultados dos testes de % de recuperação das quatro sulfonamidas estudadas com as duas condições de *clean-up* testadas.

Dentre os procedimentos empregados, o que demonstrou maior recuperação do analito foi o que empregou 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila. No entanto, estes resultados não foram melhores do que os obtidos quando não realizado procedimento de *clean up* com cartuchos de *Florisil*, optando-se, portanto pela não utilização deste passo nas demais análises para a determinação de sulfonamidas em mel.

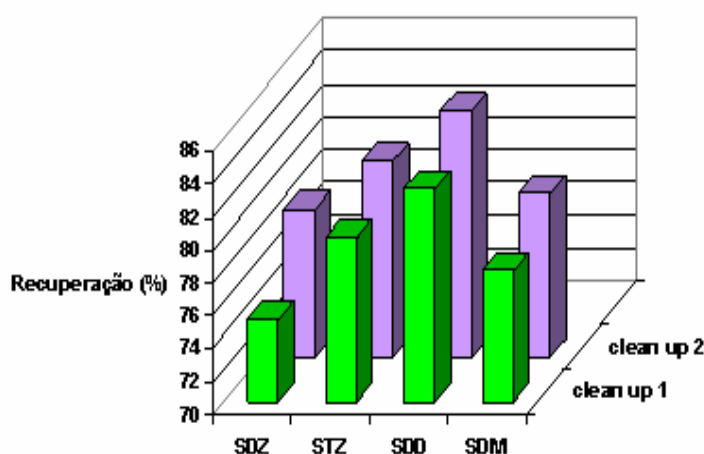


Figura 26 - Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de *clean-up*.

Depois de selecionadas todas as condições de extração, foram realizados novos experimentos de extração, em triplicata, em três níveis de concentração: 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para otimizar as condições de extração do método desenvolvido. Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração selecionadas.

Tabela 12 – Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.

Composto	Concentração		
	25 ng/g	50 ng/g	100 ng/g
SDZ			
Rec±RSD, (%)	80 ± 12,50	83 ± 8,43	85 ± 5,88
STZ			
Rec±RSD, (%)	71 ± 15,49	76 ± 11,84	80 ± 7,50
SDD			
Rec±RSD, (%)	77 ± 12,99	81 ± 9,88	83 ± 6,02
SDM			
Rec±RSD, (%)	75 ± 13,33	79 ± 10,13	81 ± 6,17

*n=3

Na Figura 27 é apresentado o cromatograma no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹ obtido após estabelecimento das condições de extração.

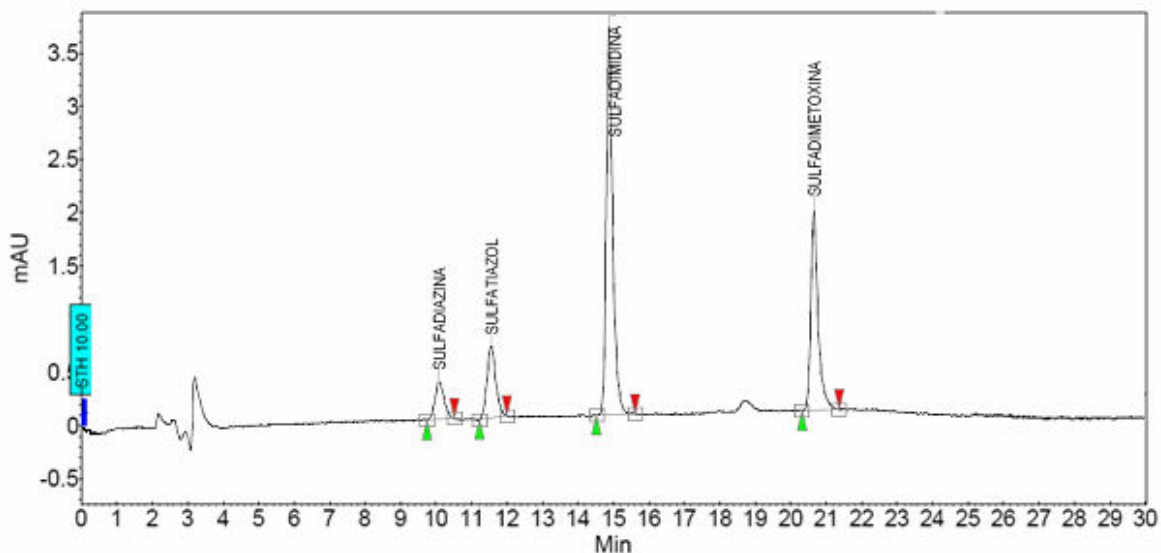


Figura 27 - Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas e otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica, como no preparo da amostra para a determinação das sulfonamidas por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de sulfonamidas no mel. Antes da validação, verificou-se a conformidade do sistema seguindo as recomendações da *Food and Drug Administration* – FDA, 2004.

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

6.6.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros da conformidade do sistema avaliados: número de pratos (N), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As), estão de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas vigentes e foram obtidos satisfatoriamente. Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos dos parâmetros para verificação da conformidade do sistema cromatográfico.

Tabela 13 - Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico

Sulfonamidas	t _R	N	k	Rs ^(*)	As
SDZ	8,45	8002,23	1,6	3,0	1,04
STZ	10,33	8710,16	2,8	6,74	1,25
SMZ	15,24	12014,63	3,4	8,44	1,20
SDM	22,09	26853,47	4,0	11,41	1,00

t_R – tempo de retenção das sulfonamidas; N – número de pratos teóricos; k – fator de retenção; Rs – resolução; As – fator de assimetria

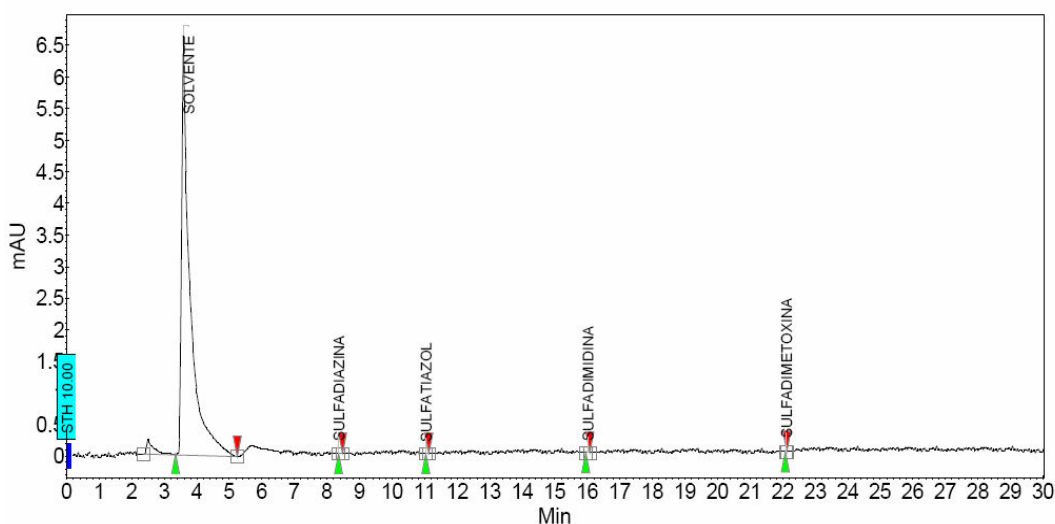
(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes.

Considerando-se as condições citadas por SHABIR [113]: $1 \leq k \leq 10$; $Rs > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

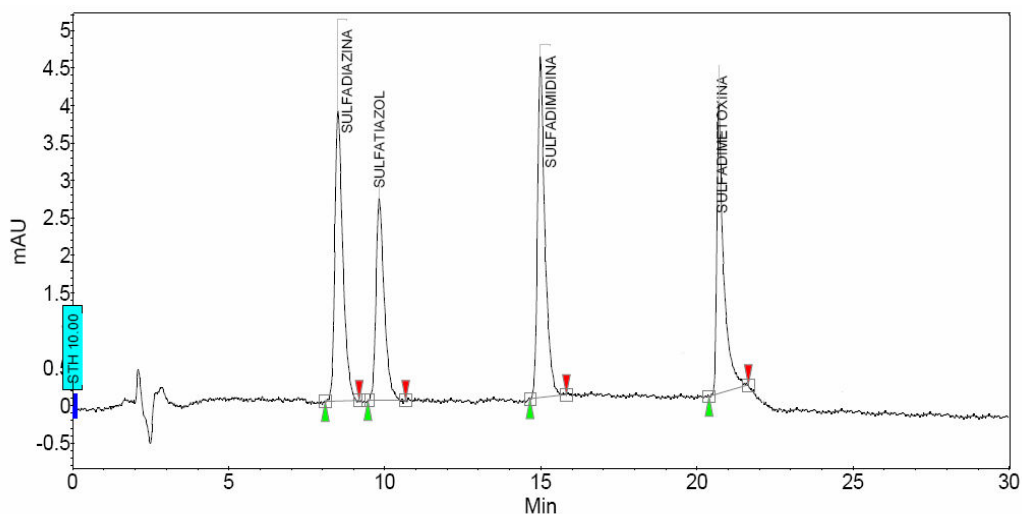
6.6.2 Seletividade

O estudo da seletividade do método teve como objetivo quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no mel. A seletividade foi testada analisando-se o extrato da amostra testemunha (extrato contendo só mel) e o extrato da amostra testemunha fortificado com as sulfonamidas (extrato contendo mel fortificado com as sulfonamidas).

No extrato da amostra testemunha não foram observados picos interferentes referentes aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, durante toda a separação cromatográfica. Foram observados apenas sinais característicos do solvente. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28 - a e b.



(a)



(b)

Figura 28 - Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.

Segundo a ANVISA não são recomendados que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito sejam superiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Como verificado na Figura 31, não existem picos interferentes, conclui-se, portanto, que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

6.6.3 Curva analítica

Foram construídas curvas analíticas, com soluções-padrão. As curvas analíticas com os padrões foram feitas com cinco injeções sucessivas (em quintuplicata), de cada ponto das curvas (25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$), sempre da menor para a maior concentração, sendo utilizada a média das leituras para a construção das curvas.

As curvas foram construídas plotando-se a área do pico *versus* a concentração do analito (Figura 29), onde y é a resposta em unidades de área e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

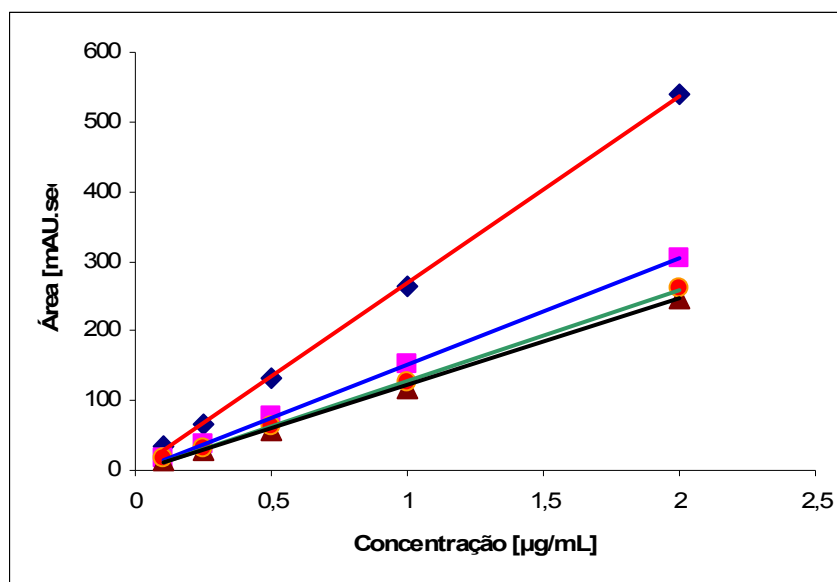


Figura 29 – Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).

Os valores das leituras foram submetidos a tratamentos estatísticos para obtenção dos coeficientes de correlação (r^2) e as equações das retas de cada sulfonamida pela extrapolação dos dados com o uso do *software Origin 6.0* e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão

Sulfa	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação de regressão	Coeficiente de correlação (r^2)
SDZ	0,025-2,0	$3,5754x - 0,021$	0.9990
STZ	0,025-2,0	$2,9936x - 0,043$	0.9996
SDD	0,025-2,0	$2,3462x - 0,019$	0.9994
SDM	0,025-2,0	$2,2321x - 0,063$	0.9983

Os coeficientes de correlação encontrados, todos superiores a 0,9900, demonstraram que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração estudado. Os resultados encontrados estão de acordo com as recomendações da ANVISA [58] para a validação de métodos analíticos.

6.6.4 Faixa linear, linearidade, sensibilidade

Para todo método existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,9900. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

A linearidade da resposta foi determinada através da habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear.

A sensibilidade foi estudada como a resposta do detector em função da concentração do analito, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

6.6.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das soluções-padrão das sulfonamidas em concentração decrescentes. Os limites de

detecção e quantificação foram calculados através das relações sinal/ruído. Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação.

6.6.6 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g⁻¹). O nível de fortificação utilizado nesta pesquisa baseou-se no LMR estabelecido pelo PNCR, do MAPA.

Tabela 15 - Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SDM
Faixa linear (µg mL ⁻¹)	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0
Sensibilidade (µau mL µg ⁻¹)	-0,021	- 0,043	-0,019	-0,063
Linearidade (r ²)	0.9990	0.9996	0.9994	0.9983
Precisão intra-ensaio (%RSD) n=5	2,84	5,24	4,31	3,01
Precisão inter-ensaio (%RSD) n=5				
25 ng g ⁻¹	12,99	11,11	12,65	10,81
50 ng g ⁻¹	5,81	8,64	7,14	6,02
100 ng g ⁻¹	3,41	4,88	3,49	3,57
LD (ng mL ⁻¹)	20	25	30	30
LQ (ng mL ⁻¹)	66	75	90	90

6.6.6.1 Precisão

Segundo o INMETRO [95] a precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Nesta pesquisa a precisão intra-ensaio foi avaliada mediante a análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, de duas amostras de mel fortificadas até a concentração de 100 ng g^{-1} . O RSD para todas as sulfonamidas ficou na faixa de 2,84 a 5,81% (Tabela 15). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de mel fortificadas em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}) em três dias diferentes, em quintuplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todas as sulfonamidas foi na faixa de 3,41 a 12,99% (Tabela 15).

Para a ANVISA [58] os intervalos de desvio padrão relativo (RSD) são considerados adequados se valores até 20% forem encontrados. Como todos os valores de RSD mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto pode ser considerado preciso.

6.6.6.2 Exatidão

A exatidão é medida com relação ao quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra [104], representado pelos valores das recuperações.

Foram realizados dois testes de recuperação, um utilizando apenas um nível de fortificação (100 ng g^{-1}) e um outro utilizando três níveis de fortificação (25, 50 e 100 ng g^{-1}). Para os testes de recuperação realizados em um mesmo dia, mesmo equipamento e mesmo analista, as recuperações variaram na faixa de 83 a 89,3%, estes resultados se encontram de acordo com os valores estipulados pela ANVISA [58], confirmando a exatidão do método.

As recuperações médias das sulfonamidas nos três níveis de fortificação avaliados de 74 a 88 %. Os menores valores de recuperação foram obtidos para o menor nível de fortificação, 25 ng g^{-1} , sendo de 72% e, proporcionalmente, a melhor recuperação foi encontrada para o maior nível de fortificação, 100 ng g^{-1} (88%). Dentre as quatro sulfonamidas estudadas, a sulfadiazina foi a que apresentou os melhores resultados em todos os níveis de fortificação (77, 86 e 88%, respectivamente).

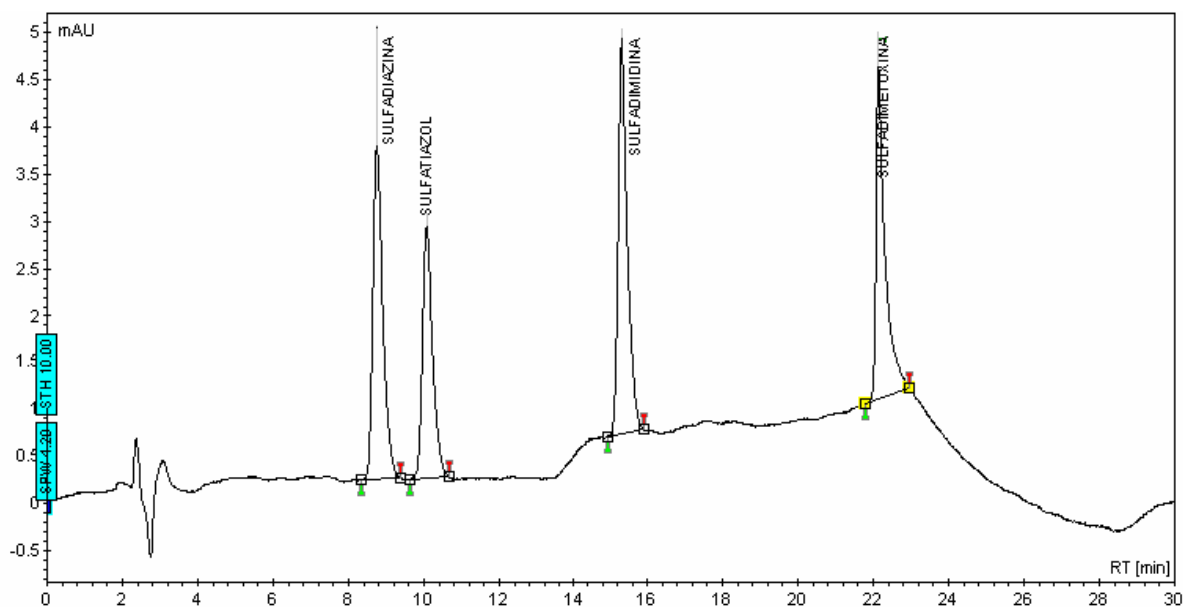


Figura 30 - Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹.

Os valores das recuperações das sulfonamidas obtidos nos três níveis ensaiados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.

Sulfa	Nível (ng g ⁻¹)	RM (%)	t _{calc}
SDZ	25	77	-1,05
	50	86	-1,40
	100	88	-2,00
STZ	25	72	-1,64
	50	81	-1,05
	100	82	-2,25
SDD	25	79	-1,05
	50	84	-1,14
	100	86	-2,33
SDM	25	74	-1,62
	50	82	-1,80
	100	84	-2,67

RM (%)= média das recuperações; t_{calc}= teste “t” de *Student* calculado

6.6.6.3 Avaliação estatística do método

Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student de significância. Na Tabela 16 são apresentados os resultados com as médias das recuperações percentuais relativas (RM%) obtidas para 5 (n-1) repetições e o t calculado para 95% do intervalo de confiança ($t_{95\%}$) do método aplicado.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados menores que o valor tabelado, $t_{tab}=2,78$, (Quadro 02 – ANEXO 2). Deste modo, aparentemente não existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), podendo-se considerar o método exato.

6.7 ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

O método proposto após ser desenvolvido e validado, foi utilizado para estimar a concentração das quatro sulfonamidas de interesse nesta pesquisa em amostras comerciais de mel provenientes do Estado do Maranhão e de estados vizinhos como o Piauí e Tocantins. Todas as amostras foram coletas no período de setembro de 2007 a março de 2008. Na Tabela 17 são apresentados o número de amostras, as cidades de coleta e suas respectivas codificações.

O objetivo destas análises foi aplicar o método desenvolvido, não realizando, portanto, um controle de qualidade mais completo nas amostras utilizadas, para o qual seriam necessárias mais amostras e aplicação de procedimentos de amostragem e coleta específicos para tal fim.

Tabela 17 – Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.

Estado	Cidade	Nº de amostras	Código
Maranhão	São Luís	01	MA1
	Santa Luzia do Paruá	01	MA2
Piauí	Teresina	01	PI
Tocantins	Paraíso	01	TO1
	Barrolândia	01	TO2

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da aplicação do método nas amostras de comerciais de mel.

Tabela 18 – Análise das amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.

Composto	Quantidade média (ng g ⁻¹) em amostras de mel, n=3				
	MA1	MA2	PI	TO1	TO2
SDZ	nd*	nd	nd	nd	nd
STZ	nd	nd	nd	nd	nd
SDD	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado, aplicando o LD de 20 ng g⁻¹ e LMR de 100 ng g⁻¹.

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os cromatogramas das amostras de méis de Santa Luzia do Paruá, São Luís, Tocantins e Piauí analisadas utilizando-se o método proposto.

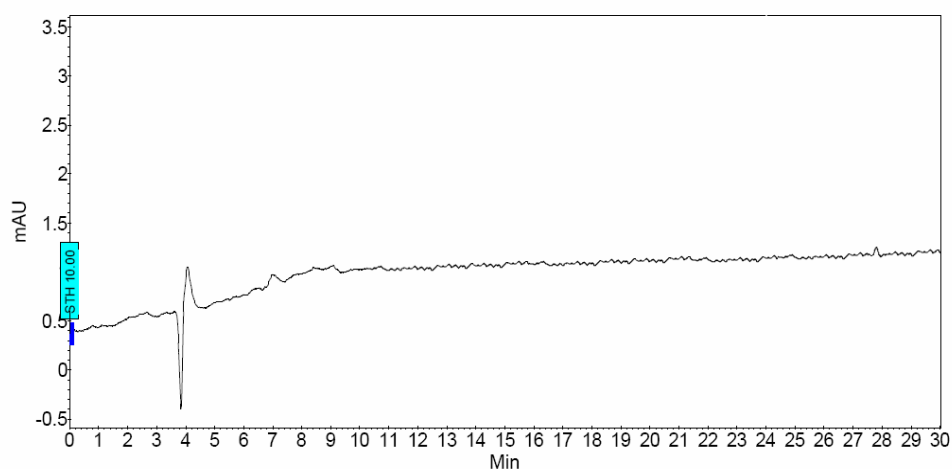


Figura 31 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá.

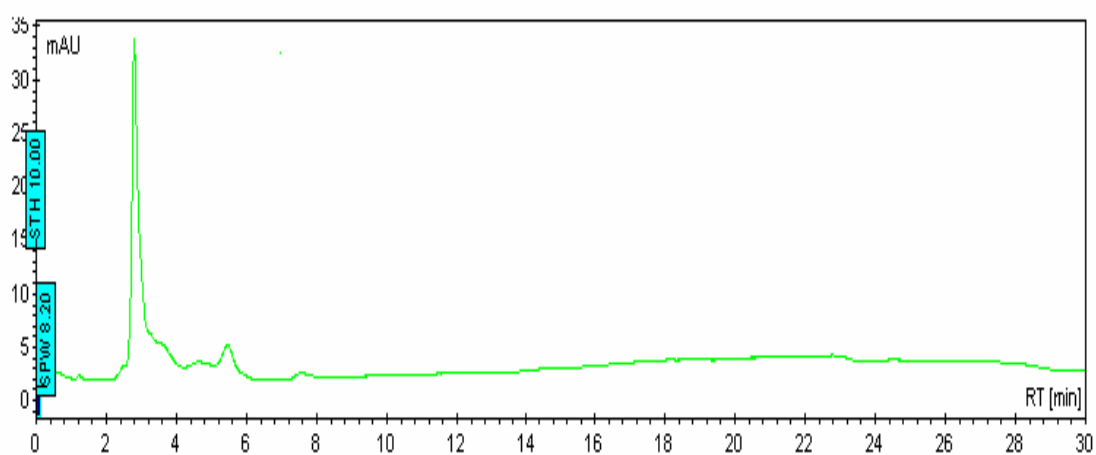


Figura 32 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.

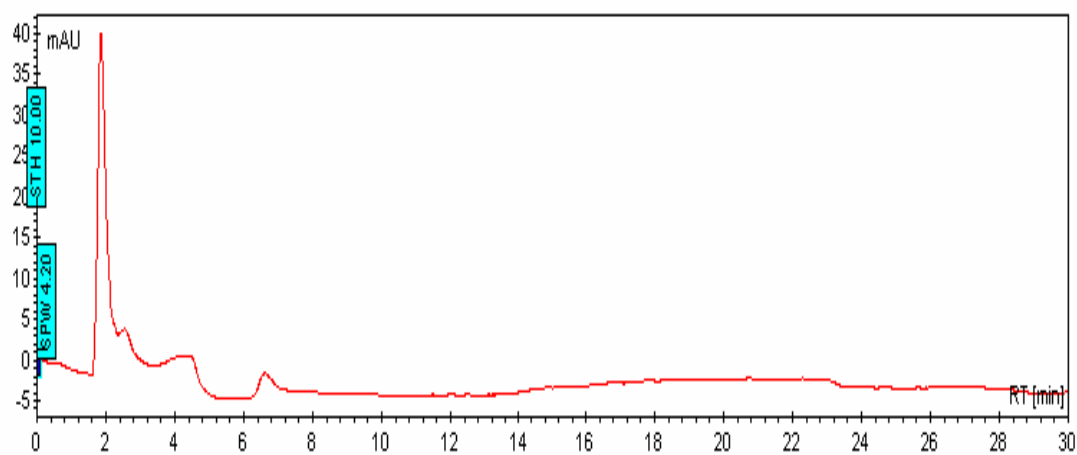


Figura 33 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins

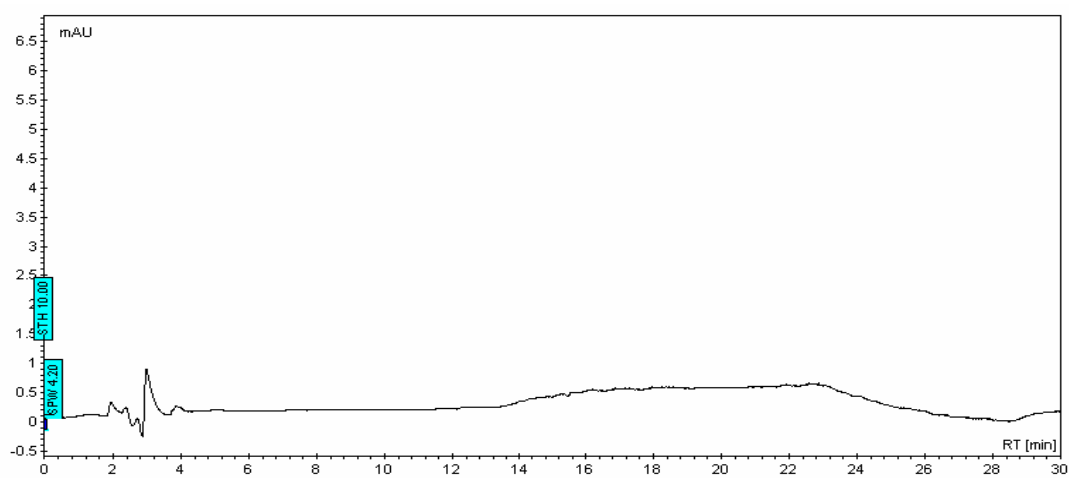


Figura 34 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí

Verifica-se pelas Figuras 31, 32, 33 e 34 que não há presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, indicando que as amostras estão livres de contaminação por resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina. Também não foram verificados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas nas outras amostras comerciais de mel estudadas.

7. CONCLUSÕES



7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel. O procedimento proposto foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato nas condições estabelecidas. Considerando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sulfonamidas ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), os limites de detecção e quantificação do CLAE-DAD apresentaram-se adequados para a análise de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel foi o preparo da amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realizou a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes.

A parte do trabalho relacionada aos estudos de pré-tratamento da amostra, ou seja, a etapa de hidrólise ácida mostrou-se eficiente para a redução do número de interferentes.

Os estudos de recuperação mostraram que para a extração de sulfonamidas em mel os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos Nexus. Foram realizados testes de recuperações em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}). As recuperações médias obtidas após otimização do método variaram de 72 a 88%, e os coeficientes de variação variaram de 2,84 a 12,99%.

Foi verificado que as amostras de mel coletadas e analisadas não apresentaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina, fato este que serve como indício da qualidade do mel produzido na Região Norte e Nordeste.

8. REFERÊNCIAS



8. REFERÊNCIAS

- [1] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000.
- [3] SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia – Relatório Completo**. Série Mercado. 2006.
- [4] PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. **Mel: Câmbio e Embargo Europeu podem prejudicar exportações em 2006**. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.4. abril/2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>> Acesso em: 19 de março de 2007.
- [5] SHIMANUKI, H. Bacteria. In: Flottum, K. (Ed.), **Honey Bee Pests, Predators, and Disease**, third ed. pp. 33–54, Medina, Ohio. 1997.
- [6] SCHWARTZ, D.P.; SHERMA, J.. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.72, 1986.
- [7] SHERMA, J.; BRETSCHNEIDER, W.; DITTAMO, M.; DIBIASE, N.; HUH, D.; SCWARTZ, J.P. **Journal of Chromatography**. v.463, p.229, 1989.
- [8] NEIDERT, E; BARANIAK, Z.; SAUVE, A. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.641, 1986.
- [9] SUN, H.; AI, L.; WANG, F. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. **Chromatographia**, v.66, N. 5/6, p.333-337, setembro, 2007.
- [10] FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M. de S.; SANTOS, J.G.R. dos; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTANA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.80-82, 2007.

- [11] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p.307-311, 2006.
- [12] GALLINA, A.; BENETTI, C.; BIANCOTTO, G.; BAGGIO, A.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; MUTINELLI, F. Antibiotics residues in honey: validation procedure. **APIACTA**, V.40, P.45-49, 2005.
- [13] ZAYAS-BLANCO, F. de; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatography separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, p.375-378, 2004.
- [14] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.
- [15] AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 3531-3539, 1990.
- [16] SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 875-879, 1990.
- [17] GARCÍA, J.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; ALDAMA, J.M. Validation of an analytical method to determine sulfamides in kidney by HPLC-DAD and PARAFAC 2 with first-order derivate chromatograms. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p. 222-234, 2007.
- [18] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European UNION REGULATION 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.23-29, 2004.
- [19] KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxyl/ N^4 -acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues and eggs. **Talanta**, v.67, p.54-58, 2005.

- [20] QUINTANA-RIZZO, J.; SALTER, R.S.; SAUL, S.J. Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin honey. **APIACTA**, V.40, P.55-62, 2005.
- [21] FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. **Chromatographia**, v.57, N. 5/6, p.317-320, 2003.
- [22] HAMMEL, Y.A; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.H.; GUY, P.A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p.58-76, 2008.
- [23] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.
- [24] MOHAMED, R.; HAMMEL, Y.-A.; LeBRETON, M.-H; TABET, J.-C.; JULLIEN, L.; GUY, P.A. Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1160, p.194-205, 2007.
- [25] LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.72, p.1082-1087, 2007.
- [26] KISHIDA, K. Quantitation and confirmatory of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, v.18, p.301-305, 2007.
- [27] BATT, A.L.; SNOW, D.D.; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, p.1963-1971, 2006.

- [28] PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, p.225-232, 2006.
- [29] KERR, W. E. **Papel das abelhas sociais na Amazônia**. Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente. (Florianópolis – SC - Brasil). 119-129. 1979.
- [30] SEBRAE, Apicultura brasileira – Produção Nacional. Disponível em : <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/IBGE.pdf> Acesso: 07 fev. 2008.
- [31] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2003 – 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1 Acesso em 23 ago, 2007.
- [32] SODRÉ, G. da S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA - APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [33] CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985, 226p.
- [34] NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [35] NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <http://www.honey.com/downloads/storyhoney.pdf> > . Acesso em: 05 ago 2007.
- [36] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.
- [37] CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura - 01).
- [38] HOOPER, T. Guia do apicultor. [S.1]: Publicações Europ-América, p. 223-266, 1976.

- [39] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [40] SHIMANUKI, H., KNOX, D.A. Susceptibility of *Bacillus* larvae to Terramycin. **American Bee Journal**. 134, 125–126. 1994.
- [41] HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., KERSTERS, K., DEVOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N., AND BERKELEY, R. C. W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ahs *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.46, 270–279. 1996.
- [42] ALIPPI, A. M., ALBO, G. N., LENIZ, D., RIVERA, I., ZANELLI, M., AND ROCA, A. E. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control of American foulbrood in honey bees. **J. Apic. Res.** v.38, 149–158. 1999.
- [43] SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**. v.313, 1072–1077. 2006.
- [44] NESTLÉ. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS, Disponível em: www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?download=M3wBPgDB/8ull6Du36WenojQ1NTTjaXZnqWfVpzLhmf> Acesso em: 05 jul. 2007.
- [45] PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- [46] GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.

- [47] FELI, M.A.F. Antibacterianos – Sulfonamidas. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/sulfonamidas2007.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- [48] MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.
- [49] WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 23, n. 4, p.362-384, abril, 2006.
- [50] MERCK, The Merck Index—**An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, Merck, Rahway, NJ, 1989.
- [51] WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.40, ISSUE 7, p. 723-730, abril, 2000.
- [52] MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Campinas-SP, 2007. 197p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. III - Universidade Estadual de Campinas.
- [53] QIANG, Z.; ADAMS, C. Potenciometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**. v.38, ISSUE 7, p.723-730, abril, 2000.
- [54] COMBS, M.T.; KHORASSANI, M.A.; TAYLOR, L.T. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight sulfonamides. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p.301-308, 1999.
- [55] O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 297-319, 1998.

[56] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[57] BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999. Disponível em: <

www.dgv.min-agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório%202006%20divulgação.pdf

> Acesso em: 22 de março de 2007.

[58] ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.

[59] DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. **In: Antimicrobials in foods**. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.

[60] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLMÍ, C.; CURINI, R. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4614-4624, 2004.

[61] MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid-chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85-92, 2004.

[62] MARTEL, A.-C.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, N. 6, p.953-961, 2003.

[63] 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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p.534-541, 2003.

[64] HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, N. 5, p.786-789, 1992.

- [65] WANG, Z.; ZHANG, S.; DING, S.; EREMIN, S.A.; SHEN, J. Simultaneous determination of sulphamethazine and sulphadiazine in a new monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay. **Food Additives e Contaminants**. v.25, p.574-582, maio, 2008.
- [66] TAMOSUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. Comparison of LC and UPLC Coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. **Chromatographia**. v.67, p. 783-788, set, 2008.
- [67] GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A M.M.; RABONE, F.; SALERMO, A.G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 116-119, jan, 2008.
- [68] ZOU, Q.-H; WANG, J.; WANG, X.-F; LIU, Y.; HAN, J.; hou, f.; xie, m.-x. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal AOAC International**, v.91, p.252-257, jan, 2008.
- [69] BISWAS, A.K.; RAO, G.S.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MALIK, J.K. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprin and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8845-8850, 2007.
- [70] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.
- [71] LAMBA, S.; SANGHI, S.K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.110-115, 2005.
- [72] PANG, G.-F.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; JIA, G.-Q; FAN, C.-L.; LI, X.-M.; LIU, Y.-M.; LI, Z.-Y.; SHI, Y.-Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.88, p.1304-1311, maio, 2005.

- [73] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p.259-264, 2005.
- [74] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSA, J.; SNIEGOCKI, T.; GRZEBALSKA, A. Sulfonamides residues in honey. Control and Development of Analytical Procedure. **APIACTA**, v. 38, p.249-256, 2003.
- [75] REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**, V.38, P.23-30, 2003.
- [76] POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p.111-117, 2002.
- [77] HELLER, D.N.; NGOH, M.A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M.H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.39-52, 2002.
- [78] STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamides residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p.37-42, 2000.
- [79] ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 898, p.95-102, 2000.
- [80] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.

- [81] HEERING, W.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAVER, E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v.123, p.2759-2762, 1998.
- [82] GEHRING, T.A; RUSHING, L.G.; CHURCHWELL, M.I.; DOERGE, D.R.; McERLANE, K.M.; THOMPSON JR, H.C. Determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 44, N. 10, 3164-3169, 1996.
- [83] 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, p.1457-1461, outubro, 1996.
- [84] VIÑAZ, P.; ERROZ, C.L.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescent derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.726, 1995.
- [85] PATHY, M. Trace analysis of sulfaquinoxaline in animal tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Vol. 275, 115-125, 1983.
- [86] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation technique for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.36-53, 2007.
- [87] LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, p.1-35, 2004.
- [88] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.68-76, 2001.
- [89] ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos – SP. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2006.

- [90] TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean up procedures and selective detectors. **Journal Chromatography A**, v.823, p.137-146, 1996.
- [91] QUEIROZ, S. C. N.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- [92] MAJORS, R. E. **LC-CG Supplement**. v.8, *maio*, 1998.
- [93] IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba – PR. p.134. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [94] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. **Química Nova**, v.27, n.5, set./out., 2004.
- [95] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ – CGCRE – 008**, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> Acesso em: 24 maio 2007.
- [96] BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.
- [97] RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. Campinas-SP, 96p. Dissertação (mestrado) - Unicamp, 2004.
- [98] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.
- [99] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. London, 1995. Q2A

(CPMP/ICH/381/95). Disponível em: www.eudra.org/emea.html. Acesso em 11 de fev. 2008.

[100] THOMPSON, M.; ELISSON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure App. Chem.**, v.74, p.835-855, 2002.

[101] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals**. Expert Consultation, 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 11 fev. 2008.

[102] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

[103] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

[104] LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76p.

[105] HUBERT, P. et al The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

[106] USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776- 1777, 1995.

[107] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em 26 de out. 2007.

[108] BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

[109] EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods**. Brussels: EUROPEAN COMMISSION, 2004. SANCO/825/00. rev.7. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf>.

Acesso em: 11 fev. 2008.

[110] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora, 2001.

[111] IBGE, Cidades - Prefeituras e Municípios 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>> Acesso em: 23 maio 2008.

[112] GOOGLE EARTH. Disponível em: <www.google.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

[113] SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

[114] SHETH, H.B.; YAYLAYAN, V.A.; LOW, N.H.; STILES, M.E.; SPORNS, P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1125-1130, 1990.

[115] SCHWAIGER, I.; SCHUCH, R. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.** v. 96, p.93, 2000.

[116] CANCHO-GRANDE, B.; FALCÓN, M.S.G.; COMESAÑA, M.R.; GÁNDARA, J.S. Determination of sulfametazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3145-3150, jun. 2001.

[117] INMETRO - INSTITUTO DE QUALIDADE E METROLOGIA. **Expressão da Incerteza de medição**, Rio de Janeiro, Apostila, 2002.

[118] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidande: validation of chromatographic methods**. Rockville: Center for Drug Evaluation

and Research (CDER), 1994. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf. Acesso em 11 de fev. 2008.

[119] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedural Manual**. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

[120] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; SANTOS, T.C.R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p.155-168, 2002.

[121] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, jul./dez., 1994.

[122] DE AMARANTE Jr; O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, São Luís, v.12, n.1/2, p.116-131, 2001.

[123] LEITE, F. In: **Validação em Análise Química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 4ª ed., 2002.

[124] CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.10.

[125] COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp. Campinas, 170 p., 1998.

[126] MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; DIEZ, M.M.; GARCÍA, M.C.M.; GIL, D.B.; CAÑADA-CAÑADA, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in Money simples. **Talanta**, v.73, p.304-313, 2007.

[127] THOMPSON, T.S.; PERNAL, S.F.; NOOT, D.K.; MELATHOPOULOS, A.P.; VAN DEN HEEVER, J.P. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.304-311, 2007.

- [128] LI, H.; KIJAK, P.J.; TURNIPSEED, S.B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: a multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.836, p.22-38, 2006.
- [129] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p.174-181, 2005.
- [130] THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p.168-176, 2005.
- [131] STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A Multiresidue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. **Analytica Chimica Acta**, v.547, p.262-268, 2005.
- [132] SOTO-CHINCHILA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCIA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)]oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p.60-67, 2005.
- [133] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y.-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8468-8473, setembro, 2005.
- [134] MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.64, p.87-100, 2004.

- [135] CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDERIS, B.M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta**, v.494, p.21-28, 2003.
- [136] FUH, M.R.; CHU, S.Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p.215-221, 2003.
- [137] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separations conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v. 98, p.153-158, 2003.
- [138] CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and eggs. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, N. 3, p.558-566, 2003.
- [139] REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.225-232, 2003.
- [140] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.153-158, 2003.
- [141] RHIJI, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A.; BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.121-133, 2002.
- [142] VERZEGNASSI, L.; SAVOY-PERROUD, M.-C.; STANDLE, R.H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.77-87, 2002.

- [143] FUH, M.-R.S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, p.1127-1139, 2001.
- [144] LINDSEY, M.E.; MEYER, M.; THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.73, N. 19, p.4640-4646, outubro, 2001.
- [145] NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C.; BERNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p.169-177, 2000.
- [146] DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p.1243-1247, 2000.
- [147] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [148] REEVES, V.B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.723, p.127-137, 1999.
- [149] KENNEDY, D.G.; McCRAKEN, R.J.; CANNAVAN, A.; HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p.77-98, 1998.
- [150] CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M.E.; DIMARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal of Chromatography B**, v. 706, p.269-277, 1998.

- [151] AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.1-40, 1995.
- [152] KRISTLANSEN, G.K.; BROCK, R. Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. **Analytical Chemistry**, v.66, N. 19, p.3253-3258, outubro, 1994.
- [153] NIESSEN, W.M.A.; USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. **Analyst**, v.119, p.2543-2548, dezembro, 1994.
- [154] PORTER, S. Confirmation of sulfonamides residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, v.119, p.2753-2756, 1994.
- [155] SHETH, H.B.; SPORNS, P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.1696-1700, 1991.
- [156] UMAGAT, H.; McGARRY, P.F.; TSCHERNE, R.J. Stability indicating sulfa drug analysis using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, N. 7, p.922-924, 1979.

9. ANEXOS



9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Quadro 01 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel – PNCR/2007.

Grupo	Analito	Matriz	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR/NA* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	Mel	CLAE/UV	25	200	7
	Oxitetraciclina (a)					
	Tetraciclina (a)					
	Sulfatiazol (b)	Mel	CLAE/UV	25	100	15
	Sulfadimetoxina (b)					
	Sulfadiazina					
	Sulfaquinoxalina					
	Sulclorpiridazina	Mel	CL/EM-EM	0,5	1(l)*	30
	Nitrofurazona – SEM					
	Furazolidona – AOZ					
	Furaltadona – AMOZ					
	Nitrofurantoina - AHD					
	Tilosina	Mel	CL/EM-EM	0,5	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	Mel	CG/EM-EM	10	10	15
	Alfa-endosulfan			10	10	
	4,4-DDE			10	10	
	4,4-DDD			10	10	
	4,4 DDT			10	10	
	Dodecacloro			10	10	
	Endrin			10	10	
	Iprodiona			50	50	
	Tetradifona			20	20	
	Captana			50	50	
	Lindane			10	10	

Fonte: BRASIL [57].

9.2 ANEXO 2

Quadro 02 – Distribuição dos valores do teste “*t*” de Student

GL (n)	t _{95%}
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086

Fonte: Instituto de Qualidade e Metrologia [2002].

9.3 CROMATOGRAMAS DOS TESTES DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

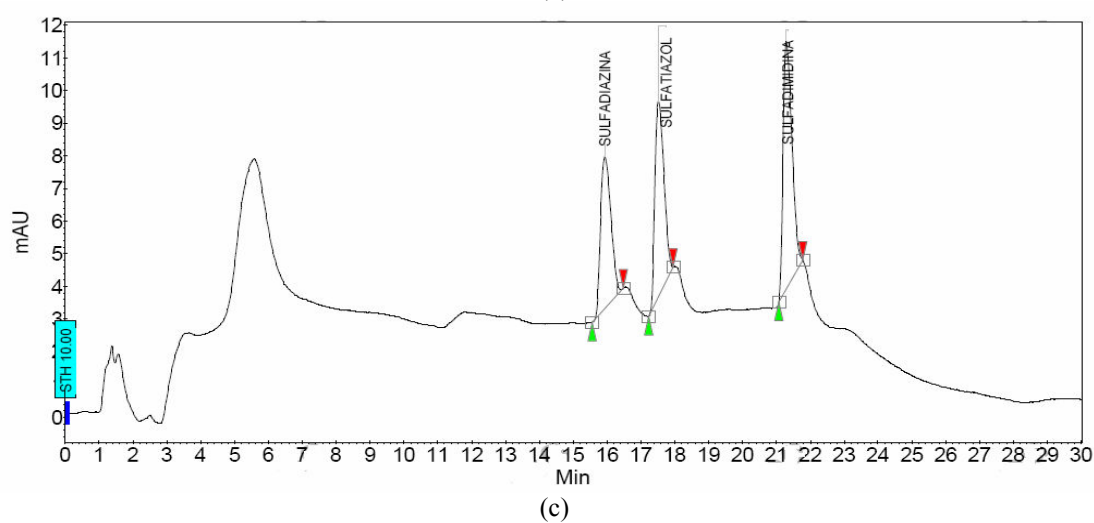
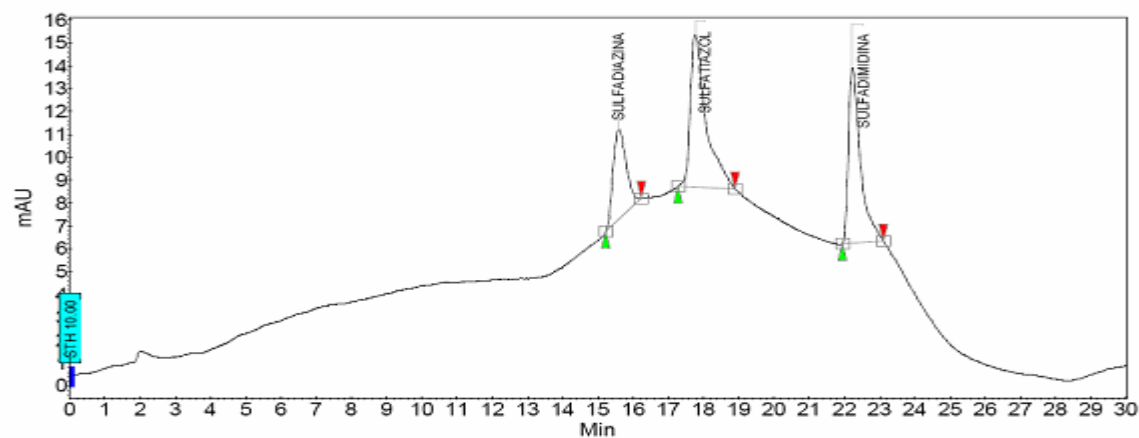
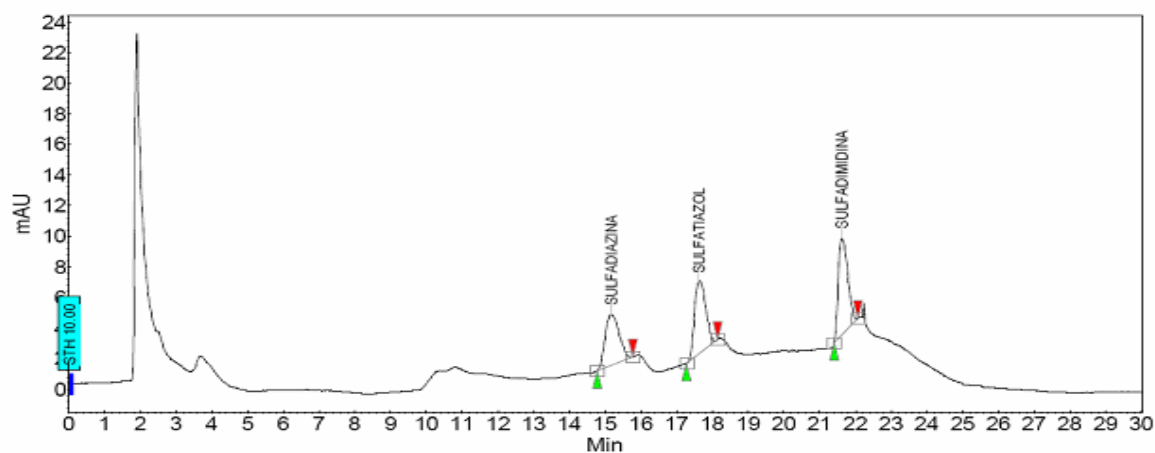
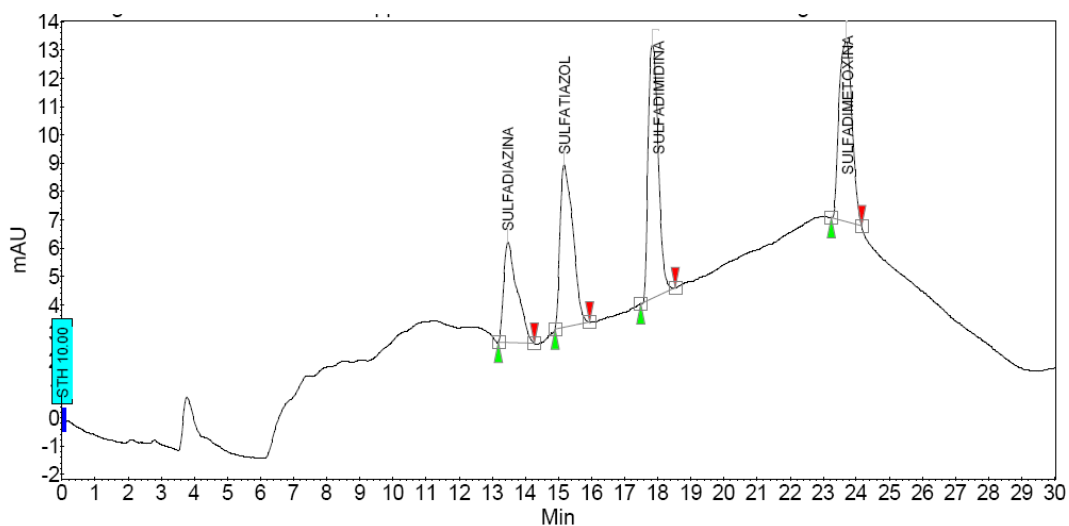
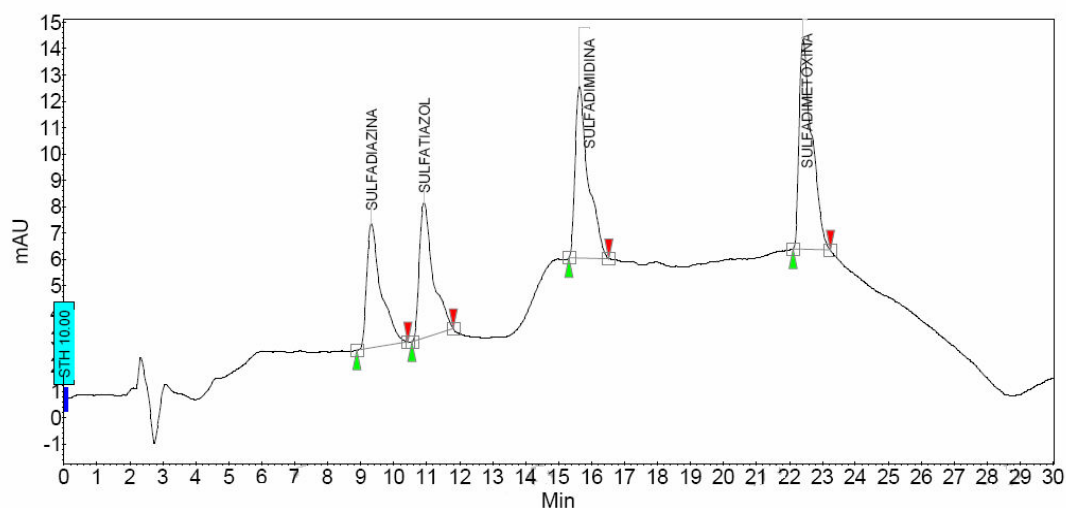


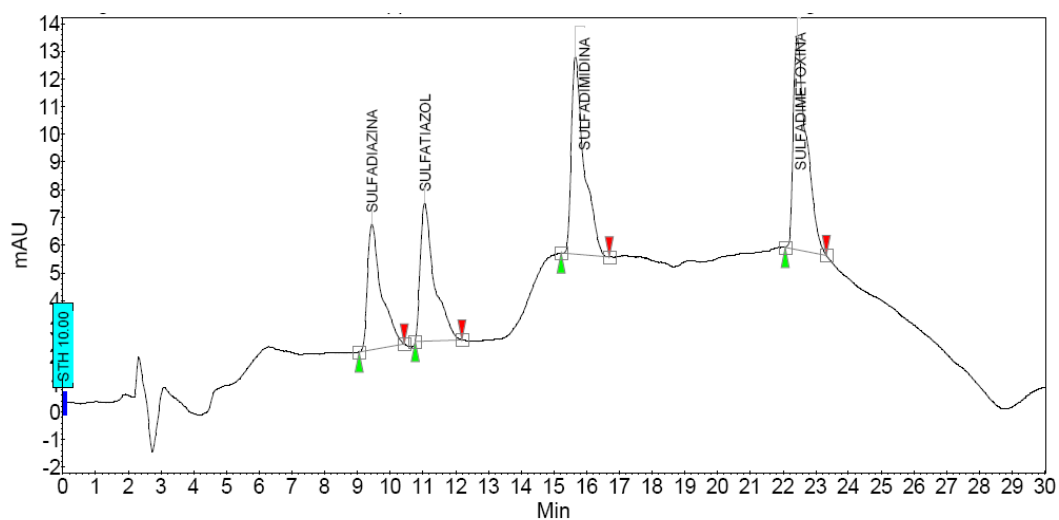
Figura 35 -Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5/Metanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 36 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

São Luís
2008

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco

São Luís
2008

Silva, Verônica Alves Gonçalves da

Desenvolvimento de metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos/ Verônica Alves Gonçalves da Silva. São Luís, 2008.

130f.

Orientador: Teresa Cristina R. dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Química. São Luís, 2008.

1. Mel – resíduos de sulfonamidas. 2. Produção de mel. 3. Extração em fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina R. dos Santos, orient. II. Título.

CDU 658.56:638.14.06

VERÔNICA ALVES GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E
DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em de de .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^ª. Dra. Teresa Cristina R. dos Santos Franco
(Orientadora)**

**Prof^º Dr. Laerte da Cunha Azeredo
(DEQUI/UFRRJ)**

**Prof^º Dr. Fernando Carvalho
(DETEQUI/UFMA)**

A Deus e a Nossa Senhora...

Aos meus pais: Maria da Penha Alves da Silva
e Êulete Gonçalves da Silva.

Ao meu amor, Fábio Silveira Vidal.

À minha sobrinha: Iracema D'monik Miranda
Gonçalves da Silva.

E ao meu irmão Fabrício C. G. da Silva.

Por todo amor, carinho e paciência.

E pelo incansável incentivo em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos memoráveis, coisas inexplicáveis e pessoas inesquecíveis”.

Ao nosso Deus, Todo Poderoso, meu Mestre, meu Pastor, meu Senhor, por ter me dado coragem para superar todas as dificuldades, por nunca me desamparar!... A Nossa Senhora, que tanto me inspira, em todos os momentos, tirando-me de todas as dificuldades e levando-me a serenidade.

Aos meus pais, que me fornecem a força necessária para tudo na minha vida, por terem me educado tão bem, ensinando-me valores essenciais para ser uma boa pessoa e uma profissional consciente e de muita ética. Agradeço ao meu pai pelo exemplo de pessoa culta e a minha mãe pelo exemplo de professora dedicada. Agradeço também à valiosa lição de sempre me mostrarem que sozinhos não somos nada, mas somos muito mais com a ajuda dos amigos.

Aos meus tios, tia Cida e tio Laerte, por desde cedo me ensinarem a amar a química e pelo exemplo de profissionalismo. Obrigada também por me ensinarem a superar obstáculos estudando.

Ao meu noivo Fábio Silveira Vidal, que tão pacientemente ouviu todas as minhas dúvidas, afagou minhas tristezas, pelo carinho, pelo companheirismo, pelas horas que passou comigo estudando química e pelo seu generoso amor que tanto me incentivou em todas as atividades sempre acreditando que eu iria conseguir.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco, por me acolher tão carinhosamente, por seu incentivo durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório NARP pela convivência.

Ao amigo, José Crediciomar pelo apoio, incentivo, paciência (para me ensinar a utilizar o equipamento (HPLC)) e pela grande demonstração de amizade.

Aos meus amigos: Gilvan, Raphael e Álvaro, amigos que fiz e aonde quer que eu vá levarei em meu coração. Agradeço a cumplicidade e agradável convívio, as conversas e os bons momentos compartilhados. Raphael te agradeço mais ainda pela grande ajuda na finalização desta pesquisa, muito obrigada meu amigo!

A querida amiga e bibliotecária, Rosivalda Pereira, pela acolhida fantástica, pelas adoráveis e produtivas conversas na biblioteca do CCET e pela grande ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

A amiga Cláudia Guerra pela convivência, pelo carinho, amizade e por ser minha família em São Luís.

Ao Profº José Wilson pela amizade e orientação profissional, desde a disciplina de catálise continuando seus ensinamentos por todo o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química: Marise e Daniele, aos funcionários do Departamento de Tecnologia Química: Alba, Ivaldo e de outros setores da UFMA, em especial a Dona Eunice e Senhor Alberto, pela constante disposição em me ajudar na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“A pesquisa científica consiste em
ver o que todo mundo já viu, mas
pensar em algo que ninguém pensou
ainda”.*

(Albert Szent-Györgyi)

RESUMO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável, não sendo permitido a presença de aditivos e/ou agentes conservadores. Na apicultura as sulfonamidas são muito utilizadas na prevenção e controle de doenças em colméias, como a cria pútrida americana causada pelo *Paenibacillus larvae*. Uma consequência desta prática é a presença destes resíduos no mel, o que pode causar reações alérgicas nos consumidores. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas no mel. No Brasil, a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A realização de programas de monitoramentos de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando possíveis danos à saúde do consumidor. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico multiresidual para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel de abelhas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A metodologia estabelecida consistiu nas seguintes condições: extração em fase sólida com sorvente Nexus, eluição com 5 mL de acetonitrila e reconstituição com solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, com adição de 1% de metanol, separação em coluna analítica C18, fase móvel acetonitrila e água, no modo de eluição em gradiente e detecção a 278 nm. O preparo de amostra consistiu na hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L^{-1} de uma alíquota de mel e ajuste para pH 4,5 com solução tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5. O método foi validado e os resultados demonstraram exatidão e precisão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Foi encontrada boa faixa de linearidade, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 41 a 89% e estimativa do desvio padrão relativo variando entre 2,36 e 14% para os quatro compostos estudados. Os limites de detecção das quatro sulfas em amostra de mel variaram de 20 a $30 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 60 a $90 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para as concentrações totais de SDZ, STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite adequada determinação das quatro sulfas em amostras de mel de abelhas.

Palavras-chave: Sulfonamidas. CLAE-DAD. Extração por fase sólida. Validação. Mel.

ABSTRACT

Honey is a natural substance produced by bees and by your nature it is considered a healthy product. Presence of additives and/or preserve agents is not permitted. On apiculture, sulfonamides are largely used on prevention and control of beehive disease, such as American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. A consequence of this practice is the presence of these residues in honey, that should cause allergy reactions on consumers. In the last years, some published works is discussing the presence of antibiotic and sulfonamides residues in honey. In Brazil, the presence of antibiotics residues in food is controlled by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and by the Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). The realization of monitoring contaminants residues in food programs, as well as the Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) from MAPA are essentials to the sanitary vigilance actions development, preventing and controlling possible hazard to the consumer health. This work has the objective the development and validation of multiresidue analytical method to the sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimidine and sulfadimethoxine determination in bee honey using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). The established methodology consisted on such conditions: solid phase extraction with Nexus sorbent, elution with acetonitrile 5 mL, and reconstitution with sodium acetate buffer (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5, with 1% methanol addition, separation on analytical column C18, acetonitrile and water mobile phase, on gradient elution mode and detection on 278 nm. The sample preparation consisted on the acid hydrolysis with hydrochloric acid 2 mol L⁻¹ of a honey rate and adjust to pH 4,5 with sodium acetate buffer solution 0,05 mol L⁻¹ pH 4,5. The method was validated and the results demonstrated accuracy and precision between the limits established by the current legislation. Good linearity range was encountered, obtaining recovery values varying from 41 to 89% and relative standard deviation estimative varying between 2,36 and 14% to the four studied compounds. The four sulfonamides detection limits in honey sample varying from 20 to 30 µg kg⁻¹ and the quantification limits varied from 60 to 90 µg kg⁻¹. Considering 100 µg kg⁻¹ the residue maximum limit established by the Brazilian legislation to the SDZ, STZ, SMZ and SDM total concentration, the described method permit suitable determination of the four sulfonamides in bee honey.

Keywords: Sulfonamides. HPLC-DAD. Solid phase extraction. Validation. Honey.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 2	Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.....	45
Quadro 3	Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.....	49
Quadro 4	Testes para seleção da composição da fase móvel.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição típica do mel.....	24
Tabela 2-	Propriedades gerais das sulfonamidas.....	27
Tabela 3-	Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.....	38
Tabela 4-	Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.....	64
Tabela 5-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	67
Tabela 6-	Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.....	74
Tabela 7-	Estudo da composição da fase móvel.....	80
Tabela 8-	Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.....	83
Tabela 9-	Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.....	87
Tabela 10-	Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)....	90
Tabela 11-	Resultados dos testes de eficiência de extração.....	91
Tabela 12-	Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.....	93
Tabela 13-	Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 14-	Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão.....	97
Tabela 15-	Parâmetros de validação para o método desenvolvido.....	98
Tabela 16-	Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.....	100
Tabela 17-	Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.....	102
Tabela 18-	Análise de amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de mel no Brasil.....	23
Figura 2	Diferentes tipos de mel.....	24
Figura 3	Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas: (a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.....	26
Figura 4	Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida)...	27
Figura 5	Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.....	28
Figura 6	(a) Esquema de cartucho para EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.....	44
Figura 7	Principais etapas empregadas EFS.....	45
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.....	50
Figura 9	Processo de fortificação das amostras.....	54
Figura 10	Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.....	59
Figura 11	(a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.....	60
Figura 12	Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.....	63
Figura 13	Procedimentos experimentais empregados nas etapas de extração EFS.....	69
Figura 14	Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.....	72
Figura 15	Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.....	75
Figura 16	Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatógrafo: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm.....	76
Figura 17	Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, 1,0 mg L ⁻¹ , usando C ₁₈ (cromatograma vermelho), C ₈ (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).....	77
Figura 18	Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto).....	78
Figura 19	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água.....	81

Figura 20	Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 4,5.....	82
Figura 21	Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de 1,0 mg.L ⁻¹	84
Figura 22	Estudo da degradação das soluções-padrão.....	84
Figura 23	Esquema da reação açúcar-sulfonamida.....	86
Figura 24	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , sem hidrólise ácida.	88
Figura 25	Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹ , com hidrólise ácida.	89
Figura 26	Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de <i>clean-up</i>	92
Figura 27	Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g ⁻¹	93
Figura 28	Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.....	95
Figura 29	Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).....	96
Figura 30	Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de 100 ng g ⁻¹	100
Figura 31	Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá	102
Figura 32	Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.....	103
Figura 33	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins.....	103
Figura 34	Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí.....	103
Figura 35	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L ⁻¹) pH 4,5/Metanol.....	129
Figura 36	Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
C8	Fase estacionária do tipo octilsilano
CODEX	<i>Codex Alimentarius</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido com detector por arranjo de fotodiodos
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
CL	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida - EFS)
t _R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Detector por absorbância no ultravioleta-visível

LISTA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

SDZ	Sulfadiazina
SMR	Sulfamerazina
STZ	Sulfatiazol
SAD	Sulfanilamide
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SID	Sulfisomidina
SMTX	Sulfametoxazol
SDM	Sulfadimetoxina
SBM	Sulfabenzamida
SDX	Sulfadoxina
SQX	Sulfaquinoxalina
SME	Sulfameter
SMX	Sulfamoxol
SMP	Sulfametoxipiridazina
SCP	Sulfacloropiridazina
SSZ	Sulfasalazina
SMDZ	Sulfametoxidiazina
SMTT	Sulfametiltiazol
SMM	Sulfamonometoxina
SAI	Sulfisoxazol
SCT	Sulfacetamida
SGN	Sulfaguanidina
SMT	Sulfametizol
STR	Estreptomicina
DHS	Diidroestreptomicina
CAP	Cloranfenicol
OTC	Oxitetraciclina
AMP	Ampicilina
TC	Tetraciclina
DMC	Democlociclina
CTC	Clorotetraciclina
NEO	Neomicina
PENG	Penicilina G
SPI	Espiramicina
DC	Doxiciclina
PEN	Penetamato
DES	Desmicosina
OLE	Oleandomicina
TIL	Tilmicosina
TYL	Tilosina
OXA	Oxacilina
EA	Eritromicina
CLOX	Cloxacilina
NAF	Naficilina
DIC	Dicloxacilina
ROXI	Roxitromicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µ	Micron
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	Minuto
sec	Segundo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
R ²	Coeficiente de Determinação ou de Correlação Múltipla ou Eficiência da Regressão
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão Amostral
t	t de <i>Student</i>
$\bar{X}$	Média aritmética
x _i	Valor Medido
Σ	Somatório
√	Raiz quadrada
σ	Desvio padrão da população

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	22
1.1.1	Características físico-químicas do mel.....	23
1.1.2	Doenças nas abelhas e na colméia.....	25
1.2	SULFONAMIDAS.....	26
1.2.1	Resíduos de sulfonamidas no mel.....	29
1.2.2	Aspectos da legislação.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS.....	35
3.1	PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	43
3.1.1	Extração por Fase Sólida (EFS).....	43
4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	48
4.1	FAIXA DE APLICAÇÃO.....	49
4.2	LINEARIDADE.....	51
4.3	SELETIVIDADE.....	51
4.4	PRECISÃO.....	52
4.4.1	Repetitividade.....	52
4.4.2	Precisão intermediária.....	53
4.4.3	Reprodutibilidade.....	53
4.5	EXATIDÃO.....	53
4.5.1	Recuperação.....	54
4.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	55
4.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	56
5.	MATERIAIS E MÉTODO.....	58
5.1	METODOLOGIA.....	58
5.1.1	Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas.....	58
5.2	MATERIAIS UTILIZADOS.....	60

5.2.1	Padrões.....	60
5.2.2	Reagentes e Solventes.....	60
5.2.3	Dispositivos para Extração por Fase Sólida.....	60
5.2.4	Coluna Cromatográfica.....	61
5.2.5	Equipamentos.....	61
5.2.6	Outros materiais.....	62
5.3	MÉTODO.....	62
5.3.1	Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas.....	63
5.3.1.1	Seleção da coluna.....	64
5.3.1.2	Linha de Base do Solvente.....	64
5.3.1.3	Conformidade do Sistema.....	64
5.3.1.4	Seleção do Comprimento de onda.....	65
5.3.1.5	Seleção da fase móvel.....	65
5.3.1.6	Preparação dos padrões.....	65
5.3.2	Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração.....	66
5.3.2.1	Pré-tratamento da amostra.....	66
5.3.2.2	Seleção do adsorvente.....	67
5.3.2.3	Condicionamento dos cartuchos.....	67
5.3.2.4	Eluição dos analitos.....	68
5.3.2.5	Extração por EFS.....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	69
5.4.1	Seletividade.....	70
5.4.2	Linearidade.....	70
5.4.3	Limites de Detecção e de Quantificação.....	70
5.4.4	Estudo de recuperação.....	71
5.4.4.1	Precisão.....	71
5.4.4.2	Exatidão.....	71
5.5	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	72
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
6.1	SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA.....	74
6.2	SELEÇÃO DA COLUNA.....	77
6.3	SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	77
6.3.1	Seleção do pH da fase móvel.....	78

6.3.2	Composição da fase móvel.....	79
6.3.3	Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho.....	82
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	83
6.5	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS.....	85
6.5.1	Pré-tratamento da amostra.....	85
6.5.2	Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração em fase sólida.....	90
6.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	94
6.6.1	Conformidade do sistema.....	94
6.6.2	Seletividade.....	95
6.6.3	Curva analítica.....	96
6.6.4	Faixa linear, linearidade, sensibilidade.....	97
6.6.5	Limites de detecção e quantificação.....	97
6.6.6	Precisão e Exatidão.....	98
6.6.6.1	Precisão.....	98
6.6.6.2	Exatidão.....	99
6.6.6.3	Avaliação estatística do método.....	101
6.7	ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	101
7.	CONCLUSÃO.....	106
8.	REFERÊNCIAS.....	108
9.	ANEXOS.....	127
9.1	ANEXO 1.....	127
9.2	ANEXO 2.....	128
9.3	ANEXO 3.....	129

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância natural, produzida pelas abelhas e por sua natureza é considerado um produto saudável. A adição de aditivos e agentes conservadores no mel não é permitida. Nos últimos anos, alguns trabalhos na literatura vêm discutindo a presença de resíduos de antibióticos e sulfonamidas em mel. Antibióticos são principalmente usados na apicultura para o tratamento de doenças bacterianas ou outros tipos de doenças infecciosas [1].

Para aceitação do produto apícola, no Brasil, é necessário que o produto obedeça ao regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A legislação vigente é descrita na Instrução Normativa N. 11, de 20 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [2]. A citada norma define tipos de mel, procedimento de obtenção, apresentação e/ou processamento, além de estabelecer limites para os dez principais parâmetros físico-químicos, importantes na avaliação da pureza, maturidade e possível adulteração do mel.

Apesar do grande potencial do mel brasileiro no mercado externo, é necessário que o produto cumpra as exigências estabelecidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), mais especificamente do Programa Setorial de Resíduos em Mel, PCRM [3]. O programa visa atender às exigências do mercado externo, em especial da Comunidade Européia, responsável por mais de 90% da exportação de mel brasileiro e estabelece, dentre outras coisas, a avaliação quanto à presença de resíduos no produto, o potencial da utilização inadequada de drogas no produto e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas. Várias classes de substâncias tóxicas são incluídas neste programa, mais especificamente organoclorados, antibióticos, metais pesados, substâncias promotoras de crescimento, tireostáticos e sulfonamidas.

A ausência de controle de resíduos no mel brasileiro foi a principal justificativa para o embargo ocorrido em 2006 na União Européia [4]. Uma das grandes preocupações do mercado apícola atual é a eliminação total de resíduos de antibióticos e defensivos agrícolas no mel. Utilizados para prevenir e tratar enfermidades nas abelhas e doenças de origem bacteriana na colméia fora da época de florada, os antibióticos, se utilizados sem o devido controle, podem causar prejuízos a qualidade do mel. A restrição do comércio internacional baseia-se no fato de que tais substâncias poderiam atingir o consumidor, que estaria ingerindo o mel contaminado, acarretando danos à sua saúde, tais como, adaptação e resistência de

bactérias no organismo. Por este motivo é que, recentemente, alguns países compradores de mel têm incluído em suas exigências um produto apícola livre de antibióticos.

Embora o uso de antibióticos em colméias seja uma prática constante dos apicultores, o Brasil possui um grande diferencial no contexto mundial, visto que existem poucos registros de doenças comuns em abelhas, principalmente na região Nordeste.

Sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, na apicultura, são utilizadas no tratamento e prevenção da “cria pútrida” em abelhas, doença provocada pelo *Paenobacillus larvae*. Uma consequência direta do uso é a ocorrência de resíduos de sulfonamidas no mel de abelhas, o que compromete a qualidade do produto [5].

Estudos para estes compostos incluem procedimentos colorimétricos como a reação de Bratton-Marshall [6;7]; cromatografia em camada delgada (CCD) [8], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) [9, 10; 11; 12; 13; 14; 15 e 16, dentre outros], cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) [17; 18; 19; 20 e 21, dentre outros] espectrometria de massas no modo “tandem” (CLAE-EM ou CLAE-EM/EM) [22; 23; 24; 25; 26; 27 e 28, dentre outros].

A literatura atualmente disponível para análise de sulfonamidas em mel ressalta a especificidade da matriz com relação à aplicação de métodos analíticos. No Brasil, existem poucos trabalhos com sulfonamidas em mel. A disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos apícolas, quanto à presença de resíduos de sulfonamidas, é essencial para fornecer aos apicultores garantias sobre a qualidade de seu produto, garantindo-lhes condições de exportar. Pelo exposto é que veio o interesse em fazer esta pesquisa. Este trabalho também poderá ser utilizado como um incentivo na realização de novos estudos envolvendo sulfonamidas em alimentos (matrizes diferentes de mel).

1.1 MEL E SUAS CARACTERÍSTICAS

O Brasil tem um grande potencial apícola, devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variedade edafoclimática existente, o que possibilita produzir mel o ano todo [29]. A apicultura é uma atividade que se enquadra no tripé da sustentabilidade podendo favorecer programas de desenvolvimento econômico, social e ecológico como os existentes no Nordeste brasileiro. Em 2004 o Brasil alcançou a posição

de 11º produtor mundial de mel (40 mil toneladas) e o 5º exportador mundial (21 mil toneladas). No cenário mundial, os principais produtores de mel são China, Estados Unidos e Argentina e os maiores exportadores são China, Argentina, México e Alemanha. No Mercosul, o Brasil é superado apenas pela Argentina. A produtividade brasileira ainda é baixa [3].

Dos produtos apícolas o mel é o que tem maior destaque para o comércio. A região Sul é a principal região produtora de mel no país com 47,72%. A região Nordeste vem na segunda posição com 31,58% da produção, seguida das regiões Sudeste (16,22%), Centro-Oeste (2,87%) e Norte (1,62%) [3].

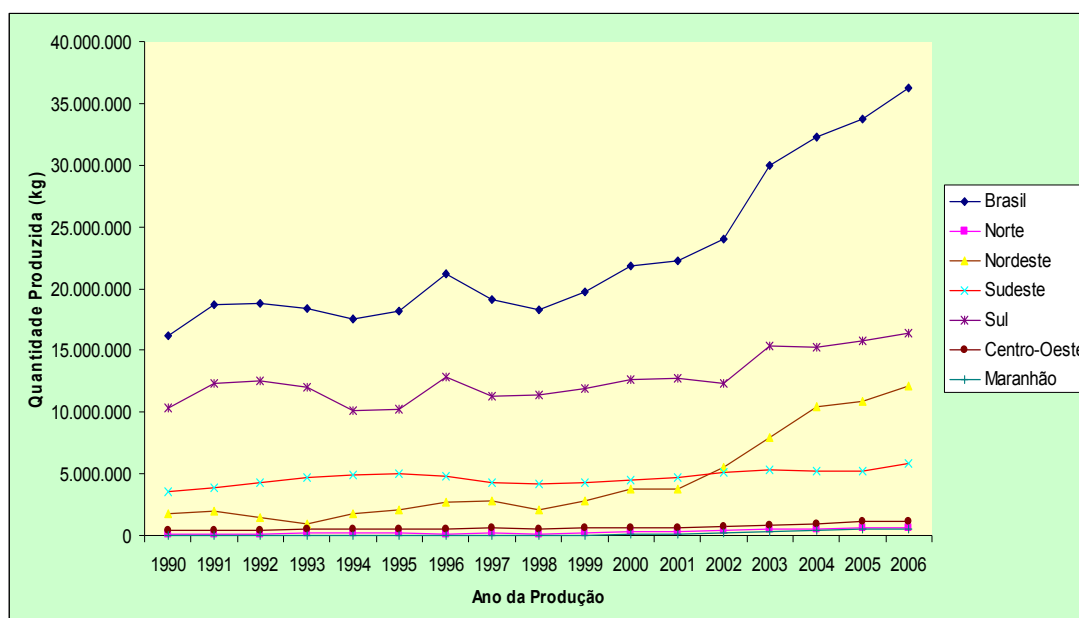


Figura 1 – Produção de mel no Brasil.

Fonte: adaptado de [30]

Segundo dados do IBGE [31] o Maranhão, no ano de 2005, passou a ocupar a 10ª posição no *ranking* nacional, tendo alcançado um aumento de produção de 289 % em relação à estatísticas realizadas pelo mesmo órgão no ano de 2001, comprovando-se o grande potencial de produção do estado.

1.1.1 Características físico-químicas do mel

O mel (Figura 2) é um produto biológico muito complexo, devido a sua composição variar com a flora e ser influenciado pelas condições climáticas e edafológicas da

região onde foi produzido [32]. Segundo Crane [33] mel é o resultado da desidratação e transformação do néctar, portanto a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar.



Figura 2- Diferentes tipos de mel.

Fonte: Internet: [34]

A composição físico-química do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais também estão diretamente relacionados com a fonte do néctar que o originou e assim como com a espécie da abelha que o produziu [32]. A Tabela 1 apresenta uma visão geral da composição química do mel.

Tabela 1 - Composição típica do mel.

Componente	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76-1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 -40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020-1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	----
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68-59,49	10,33
Proteína (%)	0,1686	0,0577-0,567	7,09

Fonte: NATIONAL HONEY BOARD [35].

Sabor e aroma. O sabor e aroma característicos do mel são conferidos pela presença dos compostos voláteis. O aroma e o sabor estão no seu ponto ótimo quando o mel é retirado

diretamente da colméia, pois podem ser modificados pelo processamento usado para extraí-los dos favos [36]. Os aromas podem ser classificados em característico, adocicado, floral, cera e queimado. Já o sabor pode ser classificado como característico, adocicado, floral, cera, queimado, ácido e residual.

Cor. “A coloração do mel” é normalmente interpretada como algo mais escuro que creme e mais claro que marrom. A cor do mel líquido pode realmente variar de branco-aquoso a próximo de preto, com variantes tendendo para matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul [33].

Água. O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% [37]. Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. A quantidade de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade [32].

Açúcares. O poder adoçante do mel é avaliado em cerca da metade do atribuído ao mesmo peso de açúcar de cana [33]. Além da doçura, os açúcares são responsáveis por outras características, tais como: capacidade de conservação, poder higroscópico e habilidade de promover cor e sabor [38]. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5% a 40% para a glicose e de 36,2% a 49,6% para a frutose, de acordo com a florada [39].

Diversos. Outros componentes importantes presentes no mel são as enzimas, os aminoácidos, os ácidos orgânicos e minerais.

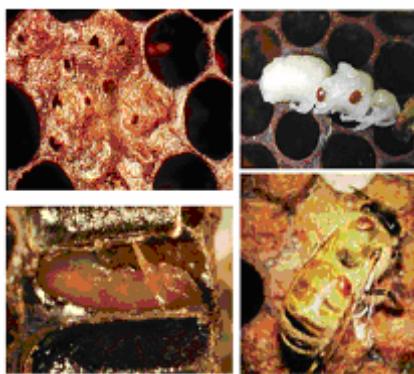
1.1.2 Doenças nas abelhas e na colméia

Assim como em seres humanos as abelhas são susceptíveis a numerosas enfermidades, necessitando de tratamentos adequados à base de fármacos como as sulfonamidas para prevenção e/ou tratamento destas. Na Figura 3 são apresentadas as doenças que mais afetam abelhas e colméias. Dentre as enfermidades que mais as afetam está a cria pútrida.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (*American Foulbrood*), é produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas [40; 41]. O tratamento ocorre pela administração dos antibióticos na água ou através de alimentação artificial contendo a medicação, geralmente administrada, antes da florada [42].

Este tipo de doença quando acontece é capaz de dizimar dezenas de colméias, sendo uma enfermidade muito temida pelos apicultores.

O Brasil tem se destacado no cenário internacional por ter praticamente erradicado esta doença. A grande questão que envolve doenças na apicultura, assim como em outras atividades produtoras de alimentos, é a utilização de fármacos na prevenção ou tratamento destas. As sulfonamidas são compostos que podem ter sua ação prolongada por muito tempo dependendo do tipo de matriz a qual ela está presente [43]. O uso inadequado de fármacos na prevenção ou controle de doenças na colméia pode acarretar danos a qualidade do produto e causar problemas na saúde do consumidor, uma vez que a contaminação do mel com resíduos de sulfonamidas numa colméia mantém-se durante anos.



(a)

(b)

Figura 3 – Doenças mais freqüentes nas colméias e nas abelhas:
(a) Cria Pútrida Americana e Européia e (b) Varroa.
Fonte: Internet: [44]

1.2 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, tendo sido desenvolvidas em 1935, pelo cientista Gerhard Domagk [45]. São compostos derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Figura 4). Sua classificação é realizada com base no grau de absorção pelo trato gastrointestinal e através da duração de seu efeito [46].

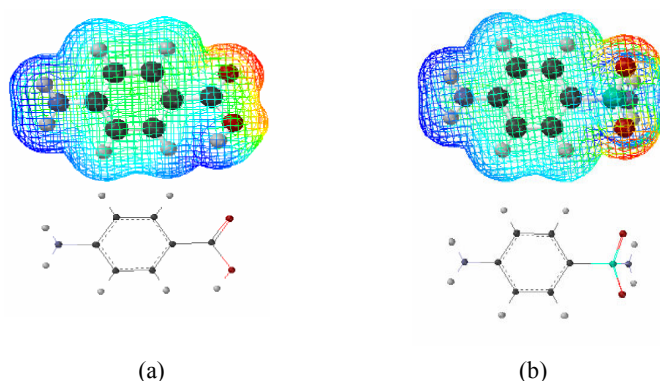


Figura 4 - Estrutura química: (a) Prontosil rubrum e (b) PABA (Sulfanilamida).
Fonte: Internet: [47]

Possuem ação bacteriostática e atuam competindo com o ácido *p*-aminobenzóico na síntese enzimática do ácido didrofólico, agindo de forma sistêmica, com ação de curta ou longa duração, dependendo do tipo [48].

Os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana das sulfonamidas estão reunidos na própria molécula da sulfanilamida. O grupo – SO₂NH₂ não é essencial em si, mas tem a importante característica do enxofre estar diretamente ligado ao anel benzênico [48].

Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, *pKa*, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica [48].

Quimicamente, as sulfonamidas são ácidos fracos, relativamente insolúveis em água, que apresentam *pKa* variado e são iônicas por natureza [49]. Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas relevantes das sulfonamidas em estudo nesta pesquisa.

Tabela 2 – Propriedades gerais das sulfonamidas.

Composto	CAS- Number	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)*	Sol. em H ₂ O* (mg /100 mL)	Log K _{ow}	<i>pKa</i>
Sulfadiazina	[68-35-9]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.26	13	0,12 ^b	6,50
Sulfadimetoxina	[122-11-2]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1	1,4 ^a	6,21
Sulfadimidina	[57-68-1]	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	272.33	192	0,25 ^a	7,45
Sulfatiazol	[72-14-0]	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.32	1	--	7,24

Fonte: *[50] ; ^a [27]; ^b [51]

A solubilidade das sulfonamidas varia muito em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional. Em meios alcalinos a solubilidade é maior que em pH neutro e ácidos, aumentando em meio ácido de sais sódicos [52].

Em sua molécula as sulfonamidas contêm um grupo amina básico (-NH_2) e um grupo amida ácido (-NH-) que correspondem ao $\text{p}K_{a1}$ e $\text{p}K_{a2}$, respectivamente; apresentando caráter anfótero, ou seja, em soluções básicas o comportamento das sulfonamidas é ácido, devido ao N1 (nitrogênio ácido, que apresenta capacidade de doar prótons), já em soluções ácidas o comportamento das sulfonamidas é básico, devido ao N4 (nitrogênio básico - que apresenta capacidade de captar prótons). A completa ionização é conseguida quando o pH do analito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de $\text{p}K_a$, para compostos ácidos e básicos, respectivamente [53].

Na Figura 5 é apresentado um esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio. Em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

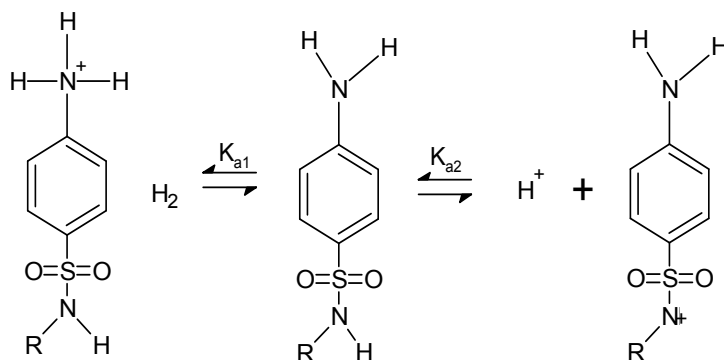
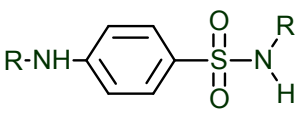
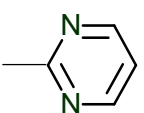
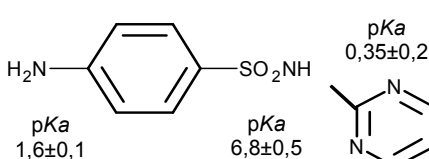
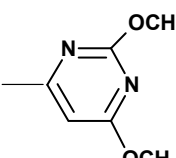
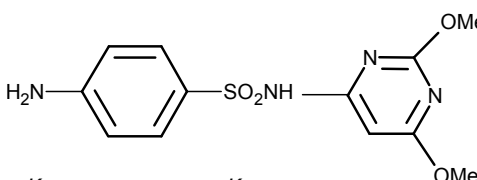
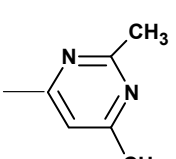
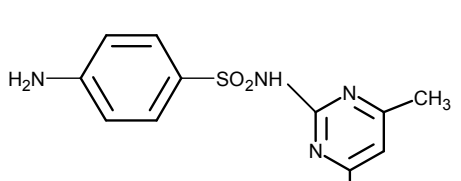
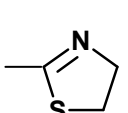
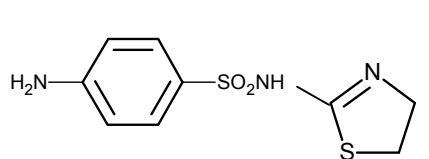


Figura 5 – Esquema de dissociação das sulfonamidas no equilíbrio.
Fonte: [53]

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares das sulfonamidas selecionadas para este estudo, bem como as variações dos valores de $\text{p}K_a$ dos respectivos grupos funcionais das sulfonamidas.

Fórmula Geral das Sulfonamidas		
		
Sulfonamida	Radical	Estrutura Completa
Sulfadiazina (SDZ)		 pK_a 1,6±0,1 pK_a 6,8±0,5 pK_a 0,35±0,2
Sulfadimetoxina (SDX)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfadimidina (SDD)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5
Sulfatiazol (STZ)		 pK_a 0,7±0,1 pK_a 6,5±0,5 pK_a 2,4±0,5

Quadro 1 – Estrutura das sulfonamidas e variações do pK_a dos grupos funcionais das sulfonamidas selecionadas para o estudo
 Fonte: adaptado de [51], [54] e [23].

1.2.1 Resíduos de sulfonamidas no mel

No que se refere à saúde pública, o monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos vem-se tornando um assunto cada vez mais discutido em nível mundial [51]. Uma grande variedade de fármacos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses,

os das classes: sulfonamidas, betalactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos [55].

Atualmente, grandes volumes de mel são solicitados por mercados internacionais, fazendo com que novas práticas apícolas sejam implantadas a fim de garantir que a produção esteja protegida de possíveis ataques de pragas, doenças ou contaminações [3].

A utilização de fármacos na prevenção e/ou tratamento de doenças na colméia é prática comum entre os apicultores. Resíduos de sulfonamidas podem ocorrer no mel como consequência da utilização destes fármacos no tratamento de doenças de origem bacteriana. A presença de resíduos de sulfonamidas no mel não é desejável, uma vez que o mel é um produto natural e saudável e que, como tal, não deve apresentar substâncias comprovadamente tóxicas.

As exposições de humanos a doses de resíduos de fármacos podem gerar possíveis efeitos prejudiciais à saúde do consumidor. Os efeitos mais comumente encontrados são reações alérgicas, desordens na flora intestinal e possível impacto da resistência de antimicrobianos utilizados em terapia humana. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se, ainda, que aproximadamente 5% dos pacientes humanos tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [56]. Deve-se salientar, entretanto, que ainda não existem evidências científicas demonstrando que esta associação seja decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [57].

1.2.2 Aspectos da legislação

Visando proteger a saúde dos consumidores, órgãos regulamentadores em saúde pública estabeleceram níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) quanto à presença de fármacos em alimentos de origem animal [57]. O LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduo com o qual não ocorra perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) [52].

No Brasil, o Ministério da Saúde é quem estabelece os LMR e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os responsáveis pelas ações fiscais de vigilância do uso de fármacos em alimentos.

Na produção de produtos de origem animal o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do MAPA. O PNCR tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do mel e de outros produtos de origem animal, no território nacional, bem como o aporte dos produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas aos conhecimentos das violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais. Para isto, são colhidas amostras dos alimentos, junto aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) [57].

O LMR de sulfonamidas em mel fixado pelo PNCR é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina (Quadro 01, ANEXO 1).

A ANVISA, recentemente, vem implantando um Programa de Análise de Resíduos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) para diversos tipos de alimentos (leite, carnes, ovos e mel de abelhas), cujo objetivo é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária [58].

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

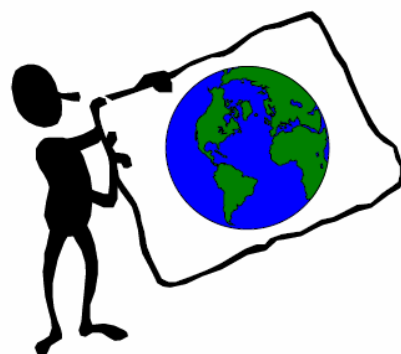
2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver metodologia para análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para determinar sulfonamidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Comparar diferentes tipos de processos de extração/pré-concentração de sulfonamidas, utilizando diferentes sorventes;
- Validar o método desenvolvido através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de méis;
- Divulgar a problemática envolvendo a presença de fármacos em alimentos.

3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS



3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM MEL E OUTROS ALIMENTOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que procedimentos de controle de qualidade de alimentos sejam realizados a fim de verificar a presença de resíduos de sulfonamidas e outros contaminantes. O desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença destes resíduos em diferentes matrizes alimentícias tornam-se fundamentais [52]. Segundo Davidson e Branem [59], o monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de medicamentos veterinários tem aumentado devido à importância da repercussão em saúde pública.

A determinação de resíduos de sulfonamidas envolve quantificação de concentrações muito baixas, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. As técnicas analíticas mais comumente usadas para a quantificação destes resíduos são as cromatográficas, associadas a diferentes sistemas de detecção, tais como UV, arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas [52].

A cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos tem sido utilizada com êxito para determinar vários resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal [18]. Embora atualmente muitos métodos confirmatórios como, o CLAE-EM/EM, para a determinação de sulfonamidas em alimentos sejam citados na literatura, estes tipos de determinação requerem o uso de equipamentos caros sendo, portanto, de menor disponibilidade na maioria dos laboratórios de química, principalmente em universidades [60].

A análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento, extração e/ou *clean up* da amostra [49] devido à necessidade de separar, de uma matriz orgânica complexa, compostos em concentrações bastante baixas, de forma a minimizar a presença de interferentes na matriz.

Vários métodos de determinação das sulfonamidas em alimentos estão disponíveis na literatura internacional. Dentre os trabalhos sobre resíduos de sulfonamidas em mel por HPLC pode-se destacar: ZOTOU e VASILIADOU [11]; MAUDENS, ZHANG e LAMBERT [61]; MARTEL e ZEGGANE [62]; PANG *et al.* [63]; HORIE *et al.* [64]; dentre outros.

Zotou e Vasiliadou [11] desenvolveram um método seletivo para determinação de resíduos de sulfonamidas em mel por SPE-RP-HPLC com detecção UV. A separação das sulfonamidas foi realizada usando coluna C18 (ODS-3), no modo isocrático, e como fase móvel utilizou-se metanol e solução-tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com 1% de ácido acético

(v/v). A detecção UV foi em 263 nm. As amostras de mel foram diluídas em solução-tampão acetato (0,05M) pH 3,6. Utilizou-se cafeína como padrão interno. A extração do resíduo foi realizada usando extração em fase sólida com cartuchos de fase polimérica (Nexus). Recuperações médias dos analitos variaram de 80 a 117%, com limites de detecção de 20 a 25 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Maudens, Zhang e Lambert [61] desenvolveram e validaram um método para determinação de doze sulfonamidas (sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina e sulfadoxina) em mel. O pré-tratamento da amostra incluiu uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico 2 mol L⁻¹, seguida por extração líquido-líquido e extração em fase sólida (utilizando cartucho de troca catiônica). A separação foi realizada utilizando-se coluna RP18, no modo gradiente, e com fase móvel constituída de acetonitrila e solução-tampão acetato (0,020 mol L⁻¹) pH 4,75. A detecção foi realizada em comprimento de excitação de 420 nm e comprimento de emissão de 485 nm. O método demonstrou boa exatidão e precisão. O pré-tratamento da amostra aumentou a eficiência do *clean up*. Foram encontradas recuperações médias, nos três níveis, variando de 38,2 a 66,8% e limites de detecção e quantificação de 1 ou 2 e 2 ou 5 ng g⁻¹, respectivamente.

Martel e Zeggane [62] descreveram um método para determinação de sulfatiazol em mel. Foi realizada uma etapa de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. Uma alíquota da amostra hidrolisada utilizando ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ e submetido a uma pré-coluna de derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com detector por fluorescência, usando coluna C18 (Hypersil BDS), no modo isocrático, e com fase móvel composta de acetonitrila e solução de ácido acético 2%. Para a detecção por fluorescência foi aplicado um comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. O limite de quantificação foi de 10 ng g⁻¹. As recuperações variaram de 60,6 a 71,8%. A estimativa do desvio padrão relativo variou na faixa de 0,5 a 2,9%.

Pang *et al.* [63] desenvolveram um método para a determinação de oito sulfonamidas (sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido fosfórico (pH 2). As amostras foram filtradas e em seguida procedeu-se à extração em fase sólida utilizando-se dois cartuchos um de troca catiônica e outro OASIS HLB. Procedeu-se à derivatização com fluorescamine. A separação foi realizada por cromatografia líquida por detecção por fluorescência, usando coluna RP 18, no modo

isocrático, e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e solução de dihidrogeno-fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹. A detecção foi realizada com comprimento de excitação de 405 nm e comprimento de emissão de 495 nm. Recuperações médias nos três níveis de fortificação variaram de 73,5 a 94,1% e coeficientes de variação de 4,35 a 16,60%. O limite de detecção foi de 0,002 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina, e 0,005 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina. O limite de quantificação foi de 0,005 mg kg⁻¹ para sulfacetamida, sulfapiridina, sulfamerazina e sulfametoxipiridazina e 0,010 mg kg⁻¹ para sulfameter, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

Horie, Satto e Nose [64] desenvolveram um método usando cromatografia líquida por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) para a determinação simultânea de dez sulfonamidas (sulfatiazol, sulfacloropiridazina e sulfaquinoxalina) em mel. As amostras foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 30% e, então, extraídas com diclorometano. Os extratos foram percolados em cartucho de Florisil para realizar um *clean up* na amostra. A separação cromatográfica foi realizada em coluna RP-18 (Lichosphere), como fase móvel utilizou-se solução de dihidrogeno fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹) e acetonitrila. A detecção foi a 275 nm. As recuperações no nível de 0,05 µg g⁻¹ foram de 62,1 a 90,2% e os limites de detecção foram 0,05 µg g⁻¹ para cada composto.

Na Tabela 3 são apresentados métodos cromatográficos assim como os métodos de extração reportados na literatura para a determinação de sulfonamidas em mel e em outras matrizes alimentícias.

Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
HAMMEL <i>et al.</i> [22]	Mel	SDZ,SMR,STZ,SPD, SAD,SMZ,TAP,SME, DAP,SID,SMTX,SDM, STR,DHS,CAP,SBM, OTC,AMP,TC,SDX, SQX,DMC,CTC,NEO, PENG,SPI,DC,PEN, DES,OLE,TIL,TYL, OXA,EA,CLOX,NAF, DIC,ROXI,AMOX,SCP	HPLC-ESI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 26-61% e Limites de detecção de 31,3-49,0 µg/kg
WANG <i>et al.</i> [65]	Mel e frango	SMT, SMR e SDZ	HPLC-DAD Imunoensaio com polarização fluorescente	Foram encontradas recuperações de 86-131%. Limites de detecção de 0.9 ng g ⁻¹ 3.1 ng g ⁻¹ .
TAMOSUNAS e PADARAUSKAS [66]	Mel e ovos	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPLC-MS/MS UPLC-MS/MS LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 80-110%. Limites de decisão de 6.61-9.43 µg kg ⁻¹ and 7.25-11.9 µg kg ⁻¹ para UPLC e LC, respectivamente.
GRANJA <i>et al.</i> , [67]	Mel	STZ, SMZ E SDM	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 61.0% a 94.5%. Limites de detecção de 3 µg kg ⁻¹ , 4 µg kg ⁻¹ and 5 µg kg ⁻¹ respectivamente
ZOU <i>et al.</i> , [68]	Mel	STZ, SPD, SDZ, SMR, SMMX, SCP, SMX, SDM	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações > 70%. Limites de detecção 4 µg kg ⁻¹ .
MOHAMED <i>et al.</i> [24]	Mel	SAD,DAP,SPD,SDZ, SMTX,STZ,SMR,SMX, SMP,SME,SCP,SQX, SDX,SDT,SSZ	HPLC-APPI-MS/MS LLE	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,4% e Limites de quantificação de 10 µg/Kg
KOESUKWIWAT <i>et al.</i> [23]	Leite	SDZ,STZ,SMZ,SMP, SMX,SDM,CTC,TC OTC,PYR	HPLC-ESI-MS SPE	Foram encontradas recuperações de 5-166% (nos vários níveis)
SUN <i>et al.</i> [9]	Envoltório para salsicha (tripa de origem animal)	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMDZ,SMT,SMMX, SMP,SIA,SMX,SDM, SQX	HPHPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 65,2-85,9%. Limites de detecção de 0,3-0,4µg/kg e limites de quantificação de 1,5-2,2 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
LU <i>et al.</i> [25]	Carne (suína)	SDZ,STZ,SMR,SMT, SMMX,SMXZ,SQX, SDMX	HPLC-ESI-MS HPLC-APCI-MS SPME	Limites de detecção de 16-39 µg/Kg e limite de quantificação de 53-130 µg/Kg
KISHIDA [26]	Carne (bovina, aves, suína)	SDD,SDZ,SMM,SMX, SDM,SQX	HPLC-MS MSPD	Foram encontradas recuperações de 90,5-97,6% e Limites de quantificação de 0,006-0,04 µg/g
GARCÍA <i>et al.</i> [17]	Visceras de animais (rim)	SDZ,SMT,SMP,SMX SDM,SQX	HPLC-DAD LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 46-63%. Limites de decisão de 3,48-3,84 µg/Kg e Capacidade de detecção de 109,8-161,7 µg/Kg
BISWAS <i>et al.</i> [69]	Carne (búfalo)	TMP,SDD,SDX,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 75-108%. Limite de detecção de 0,031µg/g e limite de quantificação de 0,062 µg/g
FELTRIN <i>et al.</i> [10]	Leite	SDX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 76-90% e limite de detecção de 4,59µg/L e limite de quantificação de 13,9 µg/L
ZOTOU e VASILADOU. [11]	Mel	SCT,STZ,SPD,SMR SMP,SMX	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 80-117% e Limites de detecção de 20-25µg/Kg
WANG <i>et al.</i> [49]	Produtos de origem animal	SAD,SCT,SGN,STZ SAI,SMX,SMT,STX SDZ,SBM,SMR,SDD SID,SMP,SME, SDM SDX,SMMX	HPHPLC,HPCE, THPLC,ELISA, IMUNOENSAIOS LLE,SPME,SPE	Vários artigos sobre sulfonamidas em alimentos de origem animal
GALLINA <i>et al.</i> [12]	Mel	Streptomycina, Tylosin, SAD,SDZ,STZ,SMZ, SDX,SMTX,SDM	HPLC-FL LLE	Foram encontradas recuperações de 11,5-96,5%. Limites de detecção de 1,7-22ng/mL e limites de quantificação de 5,5-75 ng/mL
PECORELLI <i>et al.</i> [70]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SMMX,SCP,SMX SQX,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 62,4-85,1% e Limite de decisão 105,3-109,5 µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
KISHIDA e FURUSAWA [19]	Carne (aves) e ovos	SMM,SDM,HIDRÓXI/N ⁴ -ACETIL	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 90-97% e limites de detecção de 7,2-29,8 ng/mL
LAMBA <i>et al.</i> [71]	Leite	SAD,SGN,SDZ,STZ, SMTX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 85-114%. Limites de detecção de 1,59-7,68 nmol/L e limites de quantificação de 5,3-25,59 nmol/L
PANG <i>et al.</i> , [72]	Mel	STZ, SCT, SAI, SMM, SDX,SDZ, SPD, SCP, SMTX, SMR, SMP, SDM, SMZ, SME	HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70.9-102.5%. Limites de quantificação de 1.0 and 12.0 µg/kg
POSYNIK <i>et al.</i> [73]	Carne (frango)	SDZ,SMZ,SMX,SMR, SDM,SMP	HPLC-FL MSPD	Foram encontradas recuperações de 90-95%. Limites de detecção 1 ou 5 µg/Kg CCα: 103,8-127,6 µg/Kg CCβ: 115,0-137,4 µg/Kg
MAUDENS <i>et al.</i> [61]	Mel	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SME, SMT,SMP,SCP,SDX	HPLC-FL LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 37,4-66,8%. Limites de detecção de 1-2 ng/g e limites de quantificação de 2-5ng/g
PECORELLI <i>et al.</i> [18]	Carne	SDZ,STZ,SPD,SMR, SMZ,SQX,SDM,SCP, SMM,SMX	HPLC-DAD SPE	Foram encontradas recuperações de 51-109% CCα: 105,2-116,2 µg/Kg CCβ: 110,9-134,9 µg/Kg
GENTILI <i>et al.</i> [60]	Carne e alimentos infantis	SID,SDZ,SPD,SMR, SMO,SMZ,SMT,SMP, SMM,SCP,SMX,SQX, SDM	HPLC-MS/MS	Foram encontradas recuperações de 70-101%. Limite de detecção de 2,6 ppb e limites de quantificação de 1,2-7,8 ppb
ZAYAS-BLANCO <i>et al.</i> [13]	Leite	SMZ	HPLC-UV SPE	Foram encontradas recuperações de 82,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 3µg/Kg

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
POSYNIAK <i>et al.</i> [74]	Mel	SCT,STZ,SMZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80%. Limites de detecção de 0,1µg/Kg e limites de quantificação de 0,2 µg/Kg
PANG <i>et al.</i> [63]	Mel	SCT,SPD,SMR,SMP, SME,SCP,SMX,SDM	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 73,5-94,1%. Limites de detecção de 0,005mg/Kg e limites de quantificação de 0,002 mg/Kg
REYBROECK [75]	Mel	Streptomycin, Tetracyclines, Cloranfenicols, SMZ, STZ,SCT	HPLC-UV	Limites de detecção para as sulfas de 25-50µg/Kg e limite de quantificação para as sulfas de 20µg/Kg
MARTEL e ZEGGANE [62]	Mel	STZ, SMZ	HPLC-FL IMUNOENSAIO DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 60,6-71,8%. Limite de detecção de 10µg/Kg e limite de quantificação de 2µg/Kg
FURUSAWA [21]	Leite	OTC,SDD	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 88,8-93,1%. Limites de quantificação 0,044 µg/mL (OTC) e 0,023 µg/mL(SDD)
POSYNIAK <i>et al.</i> [76]	Mel	SCT,SMT,STZ	HPLC-FL SPE	Foram encontradas recuperações de 80,9-83,4%. Limite de detecção de 0,1-0,5µg/Kg
HELLER <i>et al.</i> [77]	Ovos	SGN,SAD,SCT,SDZ, STZ,SPD,SMR,SMZ, SMT,S P,SCP,SMX, SMMX,SIA,SDM,SQX	HPLC-MS-MS HPLC-UV LLE-SPE	Foram encontradas recuperações de 51-103%
FURUSAWA [14]	Leite	SMZ,SDM	HPLC-DAD LLE	Foram encontradas recuperações de 81-94%. Limites de detecção de 5-10ng/mL e limites de quantificação de 3-5ng/mL

Continuação da Tabela 3 - Revisão de trabalhos sobre determinação de sulfonamidas em alimentos.

Referência	Amostra	Sulfonamidas	Técnica(s)	Resultados
STOEV e MICHAILOVA [78]	Produtos de origem animal	SAD,SDZ,SMR,SDD, SMP,SOX,SMX,SDM, SQX	HPLC-FL DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 64-75% e Limites de detecção de 0,5-1,0 µg/g
ITO <i>et al.</i> [79]	Visceras de animais (rins e fígado)	SDZ,SMR,SDD,SMP, SAI,SMMX,SMTX, SDM,SQX	HPLC-UV HPLC-MS/MS SPE	Foram encontradas recuperações de 70,8-98,2% e Limites de detecção de 0,03 µg/g
FURUSAWA [80]	Leite	SMZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações maiores que 83% e Limites de detecção de 4 µg/kg
HEERING <i>et al.</i> [81]	Mel	TC, Streptomycin, STZ	Imunoensaio - EIA	Foram encontradas recuperações de 100-105%. Limites de detecção de 50 µg/g
GEHRING <i>et al.</i> [82]	Salmão	SDZ	HPLC-API/MS	Foram encontradas recuperações de 59,2-78,3%. Limite de detecção de 0,2 ng/g e limite de quantificação de 1,0 ng/g
CANNAVAN <i>et al.</i> [83]	Carne	SMT	CG-MS SPE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 86-114% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
VIÑAS <i>et al.</i> [84]	Leite	SA,SGN,SDZ,SPD,SMX	HPLC-FL LLE DERIVATIZAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 82-104% e limites de detecção de 0,01-0,02 µg/g
HORIE <i>et al.</i> [64]	Mel	STZ,SDZ,SMR,SMP, SDD,SMMX,SCP, SMX,SQX,SDM	HPLC-DAD SEM EXTRAÇÃO	Foram encontradas recuperações de 62,1-90,2%. Limites de detecção de 0,8µg/g
AGARWAL [15]	Leite	SDZ	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 83-88%
PATHY [85]	Carne	SQX	HPLC-UV	Foram encontradas recuperações de 77-85%

3.1 PRÉ-TRATAMENTO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise de quantidades muito pequenas (traços) de contaminantes em matrizes complexas como alimentos frequentemente requerem inúmeras etapas de preparação e extração de amostras antes das técnicas de análises instrumentais (detecção e quantificação). Dentre as várias etapas envolvidas na preparação de amostras, alguns passos são mais comuns, tais como amostragem (homogeneização), extração, *clean-up* (eliminação de interferentes), separação e concentração, detecção e quantificação dos analitos [86].

Técnicas, como a cromatografia a líquido, requerem uma etapa de preparo da amostra antes da análise, de forma a minimizar erros na análise e evitar danos nas colunas cromatográficas [87].

Atualmente existem vários métodos para o preparo de amostras, com inúmeras possibilidades, vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método quando se trabalha com matrizes complexas, como alimentos, exigem que o analista tenha o conhecimento tanto da matriz com a qual se está trabalhando assim como da técnica instrumental que será utilizada posteriormente para a detecção/quantificação do composto, a fim de evitar, principalmente, que interferentes possam ser co-eluídos juntamente com os analitos de interesse e efeitos de matriz sejam incluídos nos resultados [88].

Segundo Queiroz, Collins e Jardim [89], as técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo do analista gasto durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras em determinado tempo.

Dentre as técnicas de extração mais comumente utilizadas para concentrar analitos em mel pode-se destacar a extração em fase sólida (EFS) [11; 63; 72; 73 e 74], extração líquido-líquido (LLE) seguida de EFS [61], e extração líquido-líquido [12 e 22].

3.1.1 Extração por Fase Sólida (EFS)

A extração por fase sólida é uma das técnicas de extração mais empregadas no preparo de amostras [88]. O método de extração por fase sólida foi desenvolvido na década de 70, visando resolver algumas desvantagens da extração líquido-líquido e otimizar rotinas [90].

É uma técnica que consiste na separação líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia clássica, através da qual a solubilidade de interação de grupos funcionais da amostra, solventes e adsorventes é otimizada para efeito de retenção e eluição [88; 91]. Através de forças intermoleculares, do tipo das de Van der Waals ou dipolo-dipolo, entre o analito e a superfície adsorvente da fase sólida ocorre o mecanismo de retenção e eluição dos analitos. Dependendo do grau de afinidade do analito com o solvente de eluição, este terá maior ou menor retenção [88].

A extração por fase sólida tem vários objetivos [87], sendo eles:

- (a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;
- (b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes;
- (c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito; e
- (d) estocagem da amostra, muito usada para evitar o transporte de grandes volumes das mesmas.

Existem dois tipos de sistemas de extração por fase sólida: em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema em linha, a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. No sistema fora de linha (*off-line*), a etapa de extração e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor [91]. Nesta pesquisa, utilizou-se o método de extração em fase sólido com sistema off-line.

Na prática, para uma extração por fase sólida são utilizados tubos de polipropileno no formato de seringa, contendo a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia), usualmente denominada cartucho de extração [88], conforme mostrado na Figura 6.

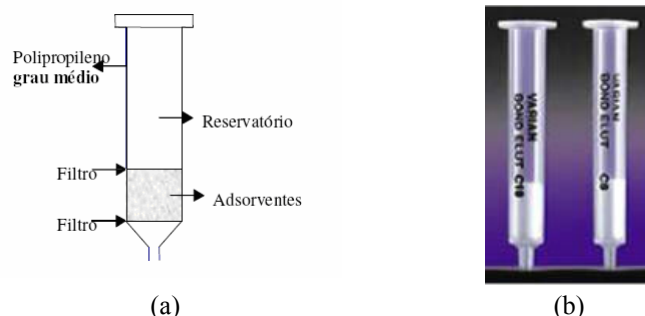


Figura 6 – (a) Esquema de cartucho para extração EFS e (b) Cartuchos comerciais para EFS.
Fonte: (a) [88]

O atual estágio de desenvolvimento da extração em fase sólida deve-se em grande parte às descobertas de novos adsorventes [89]. No Quadro 2 são apresentados os principais tipos de adsorventes utilizados em extração em fase sólida.

Quadro 2 - Exemplos de adsorventes utilizados em Extração por Fase Sólida.

Não-polares	Polares	Troca Iônica
Octadecilsilano – C18	Florisil – FL	Benzenossulfonilpropilsilano – SCX
Octilsilano – C8	Alumina – Al	Sulfonilpropilsilano – PRS
Etilsilano – C2	Sílica – Si	Carboximetilsilano – CBA
Metilsilano – C1	Cianopropilsilano – CN	Dietilaminopropilsilano – DEA
Fenilsilano – PH	Diolsilano – 2OH	Trimetilaminopropilsilano – SAX
Cicloexilsilano – CH	Aminopropilsilano – NH ₂	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA
	N-Propiletlenodiaminossilano – PSA	
	Poliméricas (Nexus)	

Fonte: adaptada de [91]

Recentemente, alguns estudos visando desenvolver fases de EFS com aplicações mais específicas têm sido desenvolvidos. As fases poliméricas são exemplos típicos destas fases, as quais possuem maior capacidade de retenção que as de sílica, tendo seletividade usualmente superior àquelas obtidas com as fases derivadas da sílica gel [93].

Na Figura 7 é apresentado um esquema do procedimento de extração em fase sólida. Na etapa A, ocorre a ativação e condicionamento do cartucho; na etapa B, ocorre a aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; na etapa C, ocorre a troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*) e, por último, na etapa D ocorre a troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

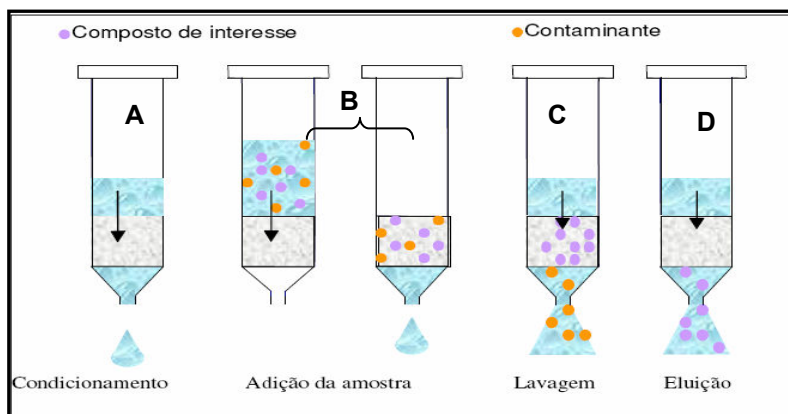
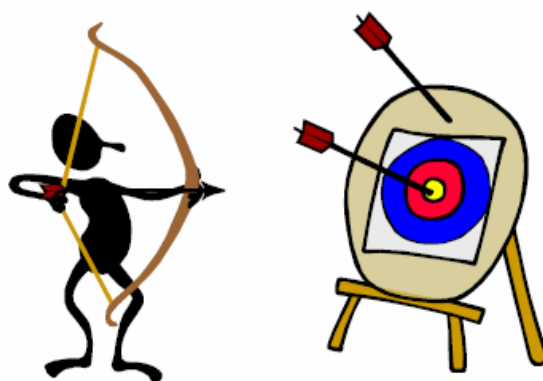


Figura 7 - Principais etapas empregadas em extração por fase sólida (EFS).

Fonte: [87]

Na prática, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com um pequeno vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Após a drenagem de toda a fase líquida, os analitos de interesse ficarão retidos na fase sólida do cartucho. O analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito pré-concentrado, ou seja, com a concentração apropriada para a análise [88].

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO



4.VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Nenhuma análise química, automatizada ou manual, fornece resultados isentos de erro. Geralmente, os resultados são reportados em forma de valores numéricos que contêm informações que devem ser corretamente interpretadas e avaliadas, de acordo com as especificações do método e as necessidades de cada usuário do mesmo resultado [93]. Neste contexto, dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico, ou mesmo a adaptação de um método já existente, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [94].

Segundo o INMETRO [95], a validação de um método de ensaio é a denominação que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida. O processo de validação de métodos analíticos desenvolvidos em laboratórios é efetuado após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos. Para Barros [96] a validação do método analítico permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido.

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [97] e que envolve várias etapas. A NBR/ISO IEC 17025 [98] define que um processo de validação deve incluir a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método. Todo processo de validação deve ser abrangente o suficiente, de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos [97].

Existem vários órgãos internacionais responsáveis por processos de validação, que estabelecem muitos conceitos e procedimentos sobre este processo, gerando um grande volume de informações. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os responsáveis por processos de validação. Estes órgãos disponibilizam guias, diretrizes ou mesmo normas, para o procedimento de validação de métodos analíticos.

No Quadro 3 são apresentados os principais critérios utilizados para a validação de métodos segundo os mais reconhecidos órgãos de regulamentação, nacionais e internacionais.

Quadro 3 - Parâmetros de validação segundo os principais órgãos de regulamentação.

Parâmetros	ANVISA	INMETRO	ICH	USP	IUPAC
Especificidade/Seletividade	x	x	x	x	x ¹
Faixa de trabalho e Faixa linear	x	x	x	x	x
Linearidade	x	x	x	x	x ¹
Limite de Detecção	x	x	x	x	x
Limite de Quantificação	x	x	x	x	x
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	-	-	-	x
Exatidão e tendência	x ¹	x	x ¹	x ¹	x
Precisão (repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade)	x ²	x	x ¹	x ¹	x
Robustez	x	x	x	x	x
Incerteza de medição	-	x	-	-	x

¹ - Realiza calibração; ² - Não realiza tendência

Os principais parâmetros utilizados para a validação de métodos cromatográficos são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez [97]. A Figura 8 mostra um fluxograma com as etapas do procedimento analítico para a validação do método para análise de resíduos de sulfonamidas em mel proposto neste trabalho.

4.1 FAIXA DE APLICAÇÃO

A faixa de aplicação de um método refere-se ao intervalo entre a concentração superior e inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade [99].

Na prática a faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, e é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão [99].

Segundo Thompson *et al.* [100], a IUPAC estabelece duas faixas de aplicação, uma para impurezas (0-150%) e outra para macro-componentes (50-150%), sendo que o valor esperado deve estar contido dentro de uma destas duas faixas. A AOAC [101] recomenda que, para análise de traços, a faixa seja compreendida entre o limite de quantificação e duas ou três vezes o Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Na análise de fármacos, a ANVISA indica uma faixa de aplicação entre 80-120% da concentração teórica do analito, e recomenda que seja determinado intervalo linear de, no mínimo, 5 níveis de concentração diferentes [102].

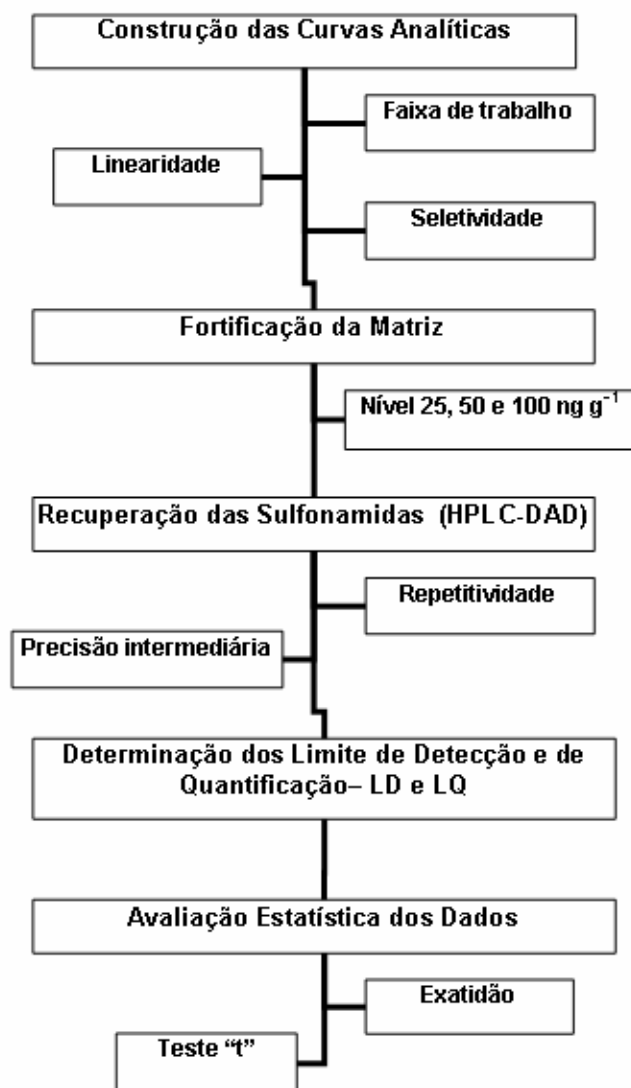


Figura 8 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para a validação do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação [97].

A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico [103]. Na maior parte das vezes uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito deve ser determinada empiricamente e pode ser representada como uma equação de reta, geralmente chamada de curva analítica ou gráfica de calibração, que representa a resposta de um método analítico como função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido [104].

Segundo Hubert *et al.* [105] uma outra forma de se avaliar a linearidade é por meio da relação entre concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear.

Em geral recomenda-se que o coeficiente de correlação seja maior que 0,990, sendo considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a regressão [95]. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [97].

4.3 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método analítico determinar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz [103]. A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da matriz, tais como, impurezas, ingredientes ativos, excipientes, e outros compostos de formas similares que possam estar presentes [106].

A seletividade é um parâmetro muito importante quando se trabalha com análises de multiresíduos. Deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, não sendo um parâmetro a ser realizado uma única vez, e sua realização deve ocorrer de forma contínua. Conhecer os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a análise ajuda na escolha das melhores condições para detecção. É através da seletividade que se garante que o pico cromatográfico seja o do composto em estudo [97].

4.4 PRECISÃO

A precisão refere-se à proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas [99]. Pode ser expressa pelo desvio dos resultados em relação à sua média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV) [97], conforme apresentado na equação 1.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: s = desvio padrão das recuperações e $\bar{X}$ = média das recuperações.

Em análises de traços são aceitos valores de RSD de até 20%, já para métodos que quantificam compostos em macro-quantidades, o RSD deve ser de 1 a 2%. A precisão também pode ser melhorada através de um maior número de replicatas [107].

Comumente, a precisão de um método analítico em validação de métodos pode ser expressa como repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade [100].

4.4.1 Repetitividade

A repetitividade (ou repetibilidade) refere-se à precisão entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições, equipamentos, analistas, em um curto intervalo de tempo [99]. O INMETRO [95] recomenda sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r').

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, sendo a mais aconselhável de ser adotada. Tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente os resultados não tenham diferença [99; 97]. O número de ensaios para a precisão intermediária segue a mesma recomendação que para a repetitividade segundo INMETRO [95].

4.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, ou seja, em localidades diferentes, utilizando um mesmo conjunto de amostras [103]. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratoriais), e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em legislações, ou farmacopéias etc... [97].

4.5 EXATIDÃO

A exatidão é estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação [103]. Sempre se considera a exatidão dentro de certos limites, a um dado nível de confiança [97]. Para a ANVISA [58] e o ICH [99] é necessário um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração.

Os procedimentos mais recomendados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição do analito. Para a análise de matrizes biológicas, como alimentos, os ensaios de recuperação são os mais utilizados [97; 103].

4.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação pode ser definido como a quantidade de analito presente ou adicionada na amostra teste, que é extraída e passível de ser quantificada [100]. A recuperação está relacionada com a exatidão, porque reflete a quantidade de determinada substância recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, sendo expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra [103].

Na prática, o estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, também sendo denominada de fortificação. A equação 2 apresenta a relação utilizada para os cálculos da percentagem de recuperação.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

Na Figura 9 é mostrado o esquema proposto por Brito [108] para representar o processo de fortificação.

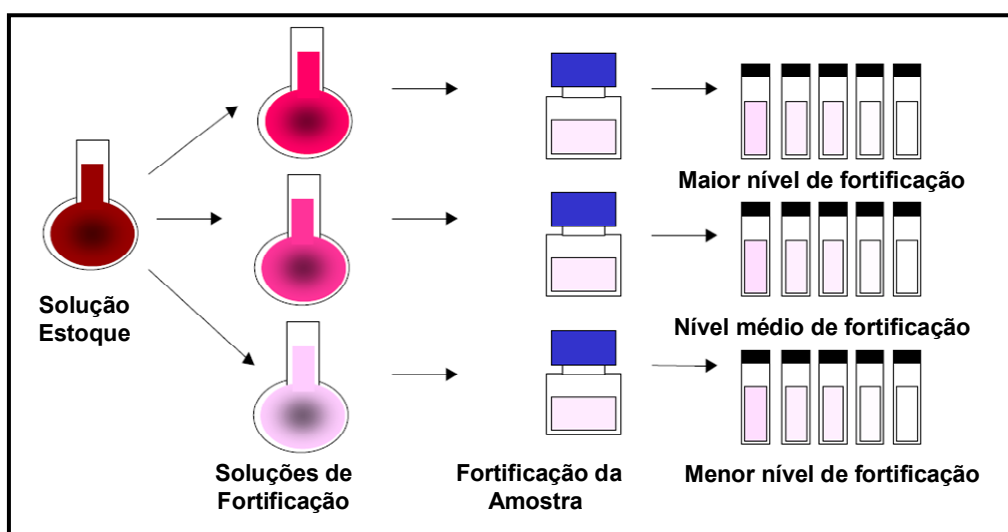


Figura 9 - Processo de fortificação das amostras.
Fonte: [108]

A limitação do procedimento de recuperação baseia-se no fato de que a substância adicionada não se apresenta na mesma forma que a encontrada originalmente na amostra, devendo-se ter o cuidado de reproduzir ao máximo as condições originais da amostra. Outro fator limitante para os ensaios de recuperação é o efeito da matriz, uma vez que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, sendo necessário investigar e eliminar estes efeitos dos interferentes [104].

Para garantir que os resultados sejam confiáveis é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, devendo-se avaliá-la na faixa de concentração esperada do composto de interesse [97].

Segundo a Comunidade Européia [109] os intervalos aceitáveis para recuperação em análises de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Contudo, em função da complexidade da composição da amostra esta faixa de variação pode ser de 50 a 120%, com precisão de $\pm 35\%$.

No estudo de recuperação também são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de *Student* de acordo com a equação 3. Se o valor “t” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato.

$$t_{calc} = \frac{(\text{Rec} - 100)}{s_{rec} / \sqrt{(n-1)}} \quad (3)$$

Onde: Rec é a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 é a recuperação percentual desejada; n é o número de determinações (em geral, um mínimo de 5 repetições); s_{rec} é o desvio padrão nas recuperações.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado de três maneiras: pelo método visual para a determinação do limite de detecção, pelo método da relação sinal/ruído e por meio do método baseado em parâmetros da curva analítica [97].

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração detectável em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas; S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*).

4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas [97]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [103].

A determinação do valor do limite de quantificação do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a validação dos resultados, tornando o método menos preciso [110]. Concentrações maiores para o limite de quantificação deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão [96].

O limite de quantificação também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o limite de detecção, sendo que para o limite de quantificação a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e, a equação utilizada é demonstrada na equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (5)$$

5. MATERIAIS E MÉTODO



5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do método para a determinação de sulfonamidas em amostras de mel cinco etapas foram planejadas. A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a revisão bibliográfica sobre a ocorrência de sulfonamidas em alimentos e mel de forma a reunir dados científicos e literatura para oferecer suporte no desenvolvimento do método. A segunda etapa consistiu no estabelecimento das condições cromatográficas mais adequadas para a análise quantitativa. Uma vez otimizados os parâmetros cromatográficos estes foram fixados e em seguida foram obtidas curvas analíticas dos compostos. Na terceira etapa foi feito um estudo de pré-tratamento da amostra utilizando hidrólise ácida e também foram estabelecidas e otimizadas as condições de extração em fase sólida. As amostras usadas nesta etapa foram às coletadas na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA. Na quarta etapa procedeu-se à validação do método proposto. A última etapa foi realizada pela aplicação do método, utilizando-se amostras de méis comerciais coletadas nos Estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins.

5.1.1 Coleta e armazenamento das amostras de mel para o estabelecimento das condições analíticas

As amostras de mel foram coletadas no apiário Turimel, localizado na cidade de Santa Luzia do Paruá-MA que está localizada na região do Alto Turu, no estado do Maranhão, às margens da BR 316. A área total do município é de 904, 95 km², localizando-se próximo à fronteira do Estado do Pará, a 420 quilômetros da capital do Maranhão, São Luís.

Segundo apicultores do local a flora comumente visitada pelas abelhas da região inclui as seguintes plantas (nomes populares): chanana, assa-peixe, vassourinha de botão, hortelãzinho, bamburral, juçara, embaúba, maria-mole, cajueiro, laranjeira e seringueira.



Figura 10 – Localização Geográfica de Santa Luzia do Paruá no Maranhão.

Fonte: adaptado de [111]

A coleta das amostras para o desenvolvimento do método foi realizada no mês de setembro de 2007. O critério estabelecido para a coleta das amostras a serem utilizadas para o desenvolvimento do método foi a ausência de resíduos de fármacos e outros resíduos de contaminantes. Optou-se por fazer a coleta neste apiário após análise do histórico produtivo do apiário, onde se evidenciou a preocupação com a qualidade do produto. O apiário, atualmente, está buscando certificação orgânica, fato este que serve como indício de que o mel produzido neste apiário seja livre de resíduos de contaminantes.

Foram coletados 30 kg de mel e estes foram armazenadas em frascos de vidro envoltos por papel alumínio a fim de evitar degradação de alguns compostos por ação da luz. Outro cuidado tomado com as amostras foi manter uma vedação dos frascos eficiente, visando impedir a entrada de ar e início de possíveis processos fermentativos. As amostras foram conservadas a temperatura ambiente.

Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para o início das atividades de pesquisa.



Figura 11 - (a) Foto da coleta do mel no apiário e (b) foto de um favo de mel ainda não operculado.

5.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram:

5.2.1 Padrões

- Sulfadiazina (SDZ) – Sigma Aldrich, com pureza de $\geq 99\%$;
- Sulfadimetoxina (SDM) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%;
- Sulfadimidina (SDD) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%;
- Sulfatiazol (STZ) – Sigma Aldrich, com pureza de 99%.

5.2.2 Reagentes e Solventes

- Metanol (HPLC solvent Merck-Germany);
- Acetonitrila (HPLC solvent Merck-Germany);
- Água ultra pura (Milli-Q), sistema Millipore;
- Acetato de Sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) M.M. 136,09 - Merck-Germany ;
- Ácido Acético Glacial P.A. (CH_3COOH)- M.M 60,05 - Merck-Germany.

5.2.3 Dispositivos para Extração por Fase Sólida

- Octadecil silano (C_{18}): cartucho - C_{18} – 500 mg/6mL – AccuBON^{II}ODS – Agilent Technologies;

- Octil silano (C₈): cartucho - Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- Cartucho: ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian.

5.2.4 Coluna Cromatográfica

- Coluna cromatográfica analítica - Phenomenex – 150mm x 4,0 µm d.i, recheada com C-18 quimicamente ligado a sílica.
- Coluna de Guarda para coluna C-18 – Phenomenex, KJ0-4282.
- Coluna cromatográfica analítica C₈ - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb-Varian.

5.2.5 Equipamentos

- Balança eletrônica, modelo Bel Mark 210A, faixa de pesagem de 10mg-210g – Bell Engineering, Italy;
- Banho ultra-som USC 1450 – Unique Thorton, Brasil;
- Bomba de vácuo – Marconi, modelo MA058, Brasil;
- Cromatógrafo a Líquido marca Varian (EUA), composto por:
 - Bombas de alta pressão - binária - Varian Polaris ProStar 210/210;
 - Injetor manual, loop 20µL - Rheodyne;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, Varian Polaris ProStar 335 – Varian (EUA);
 - Computador Digital, Intel Core 2, 2,4 GHz, HD 160 Gb, com impressora HP Deskjet D 4160;
- Deionizador de água – Milli-Q Academic System – A10, sistema Millipore (EUA);
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian (EUA);
- Rotaevaporador – Fisatom – Brasil, modelo 802;
- pHmetro Hanna Instruments, com eletrodo de pH HI 1110B (vidro combinado) modelo pH 21, Brasil;

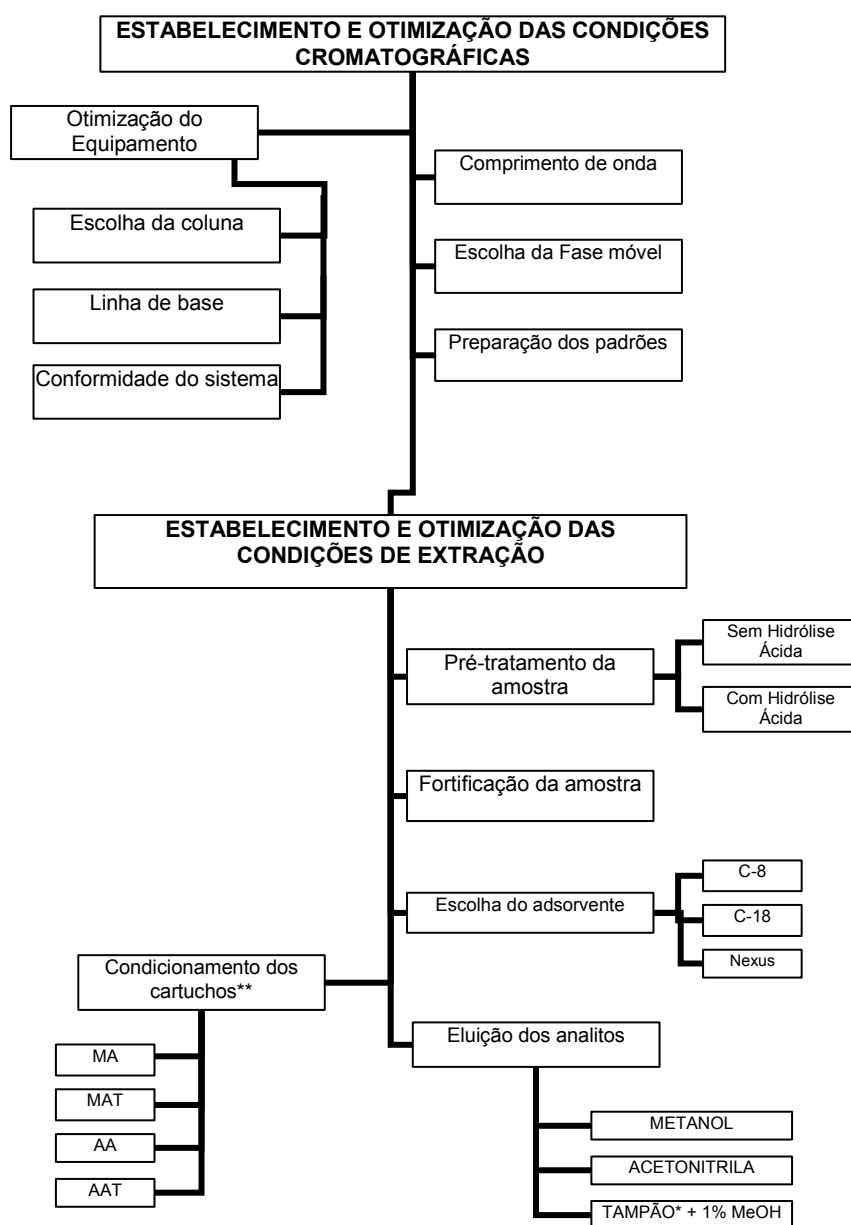
5.2.6 Outros materiais

- Balões volumétricos de 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0 e 1000,0 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 10 e 100 mL;
- Espátula de aço inox;
- Membrana Acetato de celulose, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - SartoriusMerck;
- Membrana de Vidro, diâmetro: 47 µm e tamanho dos poros: 0,45µm - Merck
- Detergente Extran – Merck;
- Outros materiais de laboratório (Becker, proveta, micro pipetadores (100-1000 µL e 10-100 µL), funil de separação, pipeta, pipeta de *Pasteur*);
- Sistema de extração a vácuo (*manifold*), com capacidade para 20 cartuchos – Varian (EUA).
- Gás nitrogênio (N₂) – *White Martins* (Brasil);

5.3 MÉTODO

Os métodos de análises de resíduos de sulfonamidas são desenvolvidos para atender as análises de analitos individuais e análise simultânea de vários resíduos, denominadas “análise multiresíduo”. O desenvolvimento de métodos multiresiduais, em geral, são muito trabalhosos, uma vez que são determinados analitos com características diferentes sofrendo também interferência dos constituintes da matriz que normalmente interferem na análise.

A Figura 12 mostra um fluxograma com a visão geral das etapas do procedimento analítico para o estabelecimento das condições cromatográficas e condições para as extrações.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

** MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.

Figura 12 - Fluxograma das etapas do processo analítico proposto para desenvolvimento do método.

5.3.1 Estabelecimento e Otimização das Condições Cromatográficas

A primeira etapa para o estabelecimento das condições cromatográficas consistiu na otimização do equipamento, onde foram realizados os experimentos para escolha da coluna, linha de base e conformidade do sistema (de acordo com os critérios citados por SHABIR,

[113]). O estudo das condições cromatográficas compreendeu seleção do comprimento de onda, escolha da composição da fase móvel e solvente para preparação das soluções-padrão.

5.3.1.1 Seleção da coluna

Para a análise das sulfonamidas foram testadas duas colunas: uma contendo a fase octilsilano C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm – Microsorb -Varian) e a outra contendo uma fase estacionária octadecilsilano C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm - Phenomenex).

5.3.1.2 Linha de Base do Solvente

É o sinal obtido pelo sistema cromatográfico detector DAD, mais a coluna utilizada com a injeção do solvente. O sinal da linha de base foi obtido injetando-se 20 µL de metanol, um dos solventes a ser utilizado nos procedimentos de desenvolvimento e validação do método. Este teste também forneceu informações sobre o grau de pureza do mesmo, que deve ser grau resíduo (CLAE), necessário para análise de traços de fármacos, com um mínimo de impurezas possível.

5.3.1.3 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada na etapa de otimização do equipamento, assim como no desenvolvimento e validação do método. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção (k'), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critérios de aceitação foram utilizados os parâmetros recomendados por Shabir [113], conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros para a conformidade do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Limites
Fator de retenção (k')	$1 < k' < 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$
Número de pratos teóricos da coluna sendo usada (N)	$N/m > 8000$

Fonte: adaptado de [113].

5.3.1.4 Seleção do Comprimento de onda

Foram realizados dois testes para obtenção dos espectros de absorção, um utilizando espectrofotômetro modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) e outro usando o próprio detector do cromatógrafo (ProStar 335 - Varian). Os espectros de absorção obtidos no espectrofotômetro corresponderam a uma varredura de 190 a 300 nm e a varredura feita no detector do cromatógrafo correspondeu a 250 a 280 nm. O comprimento de onda correspondente à absorbância média dos analitos foi posteriormente utilizado para a determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos.

5.3.1.5 Seleção da fase móvel

Para a análise cromatográfica (CLAE) dos analitos foram testados seis tipos de fases móveis, no modo gradiente.

O preparo dos solventes para a fase móvel consistiu na filtração em kit para filtração com membrana de porosidade 0,45 µm para solventes, orgânicos e água, e desgaseificação em banho ultra-som por 20 minutos para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em garrafas próprias para solventes e foram rotuladas com informações a respeito da sua composição e o valor do pH. Antes do início dos trabalhos as soluções permaneceram no banho ultra-som por 10 minutos para a retirada de gases dissolvidos.

5.3.1.6 Preparação dos padrões

As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas, individualmente, pela dissolução dos padrões em metanol. Pesou-se em balança analítica 0,0010g da sulfonamida e solubilizou-se cada uma em metanol, completando-se o balão para 0,01 L de solução. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar rotulado e com tampa de rosca para ser estocado. As soluções estoque foram guardadas no escuro, à 4°C, para evitar degradação dos padrões.

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o teste a ser realizado. Foram utilizados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho: solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 4,5 e solução aquosa de ácido acético 0,1%. As soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações e usadas para fortificação das amostras e para preparo das soluções padrão em extrato para os testes de recuperação e linearidade.

Os padrões foram injetados individualmente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após conhecido o tempo de retenção de cada composto, os padrões foram injetados juntos (solução contendo uma mistura dos quatro padrões – solução mix, a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), para proceder-se à separação analítica dos mesmos.

5.3.2 Estabelecimento e Otimização das Condições de Extração

Os métodos de análises cromatográficas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. A etapa de extração em geral é o ponto crítico da análise, por ser responsável por erros nos resultados. As etapas de estabelecimento e otimização das condições de extração consistiram no pré-tratamento da amostra (hidrólise ácida), escolha do adsorvente (C8, C18 e Nexus), condicionamento dos cartuchos (metanol:água; metanol:água:tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5); acetonitrila:água; acetonitrila:água: tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5) e escolha do solvente para eluição (metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 com adição de 1% de metanol).

5.3.2.1 Pré-tratamento da amostra

O mel é uma amostra complexa composta por várias substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes. Para diminuir o efeito da matriz na análise cromatográfica alguns trabalhos na literatura sugerem uma etapa de hidrólise ácida antes da extração a fim de romper possíveis ligações de interferentes com os analitos de interesse.

No presente trabalho, foram realizados vários testes para a determinação das melhores condições de hidrólise ácida para o pré-tratamento da amostra. A massa de mel foi fixada em 1,0 g, de forma a diminuir o número de variáveis a serem testadas. Os parâmetros estudados

foram: concentração do ácido, volume de ácido a adicionar, tempo de hidrólise e forma de agitação. Na Tabela 5 são apresentados os testes realizados.

Tabela 5 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra.

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

A etapa de hidrólise ácida propriamente dita consistiu na adição de um volume de ácido em 1,0 g de mel. A solução de mel (extrato) foi levada para agitação por um determinado tempo. Após a hidrólise ácida os extratos hidrolisados de mel tiveram seu pH ajustado para pH 4,5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e solução tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5. Os extratos de mel após ajuste do pH foram filtrados em membrana de filtração (membrana de acetato de celulose) para retirada de quaisquer partículas que possam estar presentes no extrato.

5.3.2.2 Seleção do adsorvente

Visando obter uma melhor recuperação do analito, três adsorventes foram avaliados, sendo eles:

- EFS Hypersep C₈ – 500 mg/3mL – Thermo Electron Corporation;
- EFS ABS-ELUT Nexus – 60 mg/3mL – Varian;
- EFS C₁₈ – 500 mg/6mL – AccuBOND^{II}ODS – Agilent Technologies.

5.3.2.3 Condicionamento dos cartuchos

Os solventes testados para o condicionamento do cartucho e suas proporções foram:

metanol:água (1:1); metanol:água:tampão (1:1:1); acetonitrila:água (1:1); e acetonitrila:água:tampão (1:1:1).

5.3.2.4 Eluição dos analitos

Para verificar a melhor condição de extração das sulfonamidas foram testados três solventes para eluição, sendo eles: metanol, acetonitrila e tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5 com adição de 1% metanol.

5.3.2.5 Extração por EFS

A fortificação das amostras para os estudos de extração consistiu na adição de volumes de solução padrão dos analitos no mel, de forma que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 µL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L⁻¹.

Os cálculos realizados foram realizados do seguinte modo: para se obter a concentração de 0,10 mg L⁻¹ das quatro sulfonamidas em 1000 µL de solução final, por exemplo, necessita-se de $10 \times 10^{-3} \text{ mg}$ $\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1} \right)$.

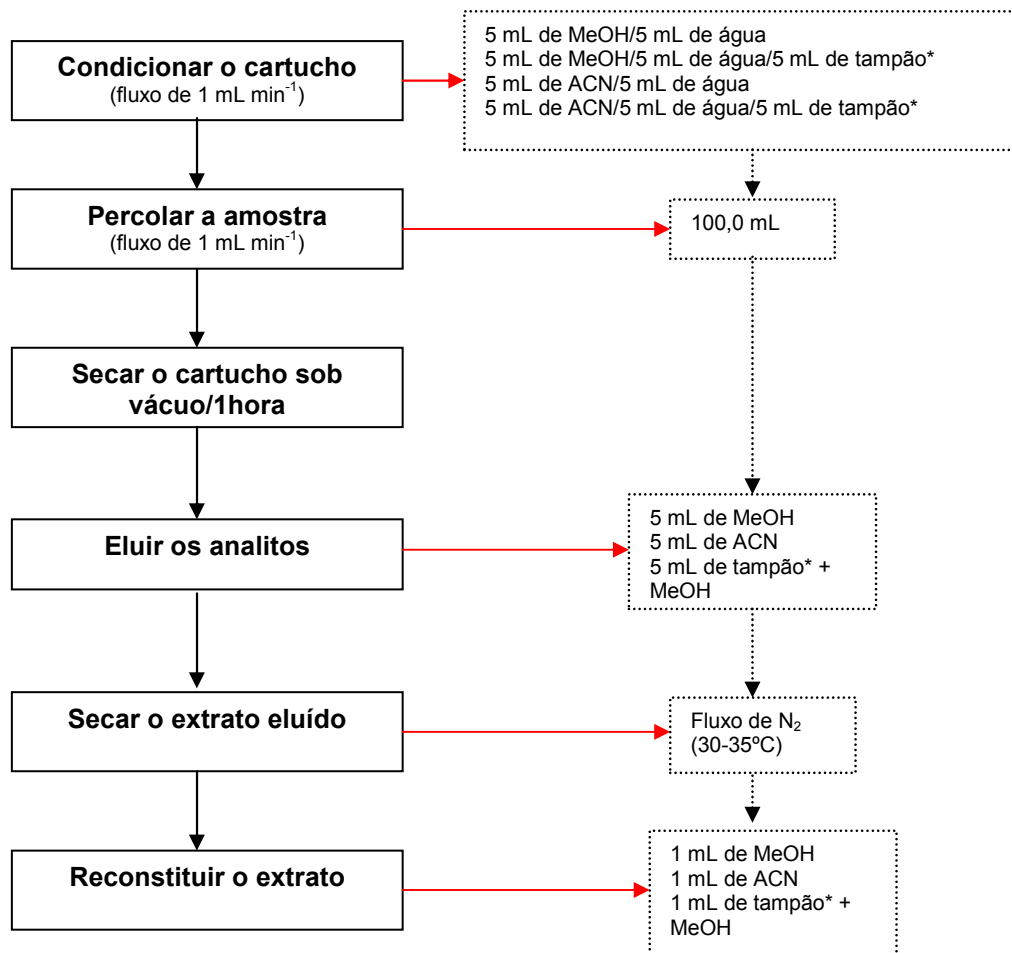
Como foi percolado um volume de 100,0 mL de extrato de mel hidrolisado enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 0,10 mg L⁻¹

$\left(C = \frac{m}{v} \rightarrow C = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ mg}}{100 \times 10^{-3} \text{ L}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \right)$. Partindo-se de uma solução estoque de 1,0 mg L⁻¹,

o volume da solução padrão mista a ser adicionado no extrato de mel é de 10 mL $\left(C_{\text{padrão}} \cdot V_{\text{padrão}} = C_{\text{amostra}} \cdot V_{\text{amostra}} \rightarrow 1,0 \text{ mg L}^{-1} \times V_{\text{padrão}} = 0,10 \text{ mg L}^{-1} \times 100 \text{ mL} \rightarrow V_{\text{padrão}} = 10 \text{ mL} \right)$.

Para a extração das amostras, testemunha e fortificada, foram realizadas utilizando-se sistema de extração (Manifold) sob vácuo. Antes da percolagem da amostra através do cartucho este foi condicionado com solventes, vazão de fluxo de 1 mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0 mL da amostra (fluxo de 1 mL min⁻¹), os cartuchos foram secos sob vácuo por 45 minutos. Procedeu-se a eluição dos analitos com 5 mL de solvente, em seguida os analitos eluídos foram secos sob N₂ a temperatura ambiente e posteriormente retomados com 1000 µL de solvente. Os extratos foram em seguida injetados para análise cromatográfica.

A Figura 13 mostra um esquema com as etapas do procedimento analítico para os testes de extração para determinação de sulfonamidas em mel.



* solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5

Figura 13 - Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração EFS.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA [60] e Comunidade

Européia (*EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE*) [109] para análise de resíduos em alimentos.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se testes em quintuplicata, de padrões e amostras testemunhas, com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada sulfonamida.

5.4.2 Linearidade

A região linear de resposta do detector foi determinada através de cálculo de regressão linear da curva analítica. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se soluções-padrão assim como com amostras testemunhas fortificadas nas mesmas concentrações que as soluções-padrão. As soluções foram preparadas a partir de uma solução intermediária de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram injetadas cinco vezes. As concentrações utilizadas para o estudo das sulfonamidas foram: 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa linear de trabalho). Construiu-se o gráfico de calibração para os compostos estudados, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo x e os valores das áreas dos picos no eixo y.

A linearidade e a sensibilidade do método foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica. A linearidade foi expressa como o coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

5.4.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O Limite de detecção (LD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas. Para isso, foram estabelecidas as concentrações mínimas dos analitos na matriz que resultaram em picos em que os mesmos puderam ser detectados e identificados com segurança, sem que fossem necessariamente passíveis de ser quantificados. O Limite de quantificação (LQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, nas soluções-padrão e em amostras testemunhas fortificadas.

Determinou-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse para calcular os limites de detecção e de quantificação.

5.4.4 Estudo de recuperação

Os estudos de recuperação foram utilizados para avaliar o método quanto à precisão e exatidão; este foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 5.5).

O procedimento experimental consistiu da adição de volumes da solução padrão no mel, para que a concentração final do analito após a etapa de extração, em 1000 μL de extrato final, fosse: 0,025, 0,050 e 0,10 mg L^{-1} .

5.4.4.1 Precisão

Foram realizados dois testes quanto à precisão do método. Verificou-se a precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise, em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de duas amostras de mel fortificadas a concentração de 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, os testes foram realizados em quintuplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Já a precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de duas amostras de mel em 3 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 25, 50 e 100 ng g^{-1} de cada sulfonamida, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

5.4.4.2 Exatidão

Os resultados e as conclusões com os dados obtidos do método analítico foram submetidos à avaliação estatística, e a expressão dos resultados foi apresentada em um determinado intervalo de confiança relacionado com os valores de exatidão e precisão dos resultados. Aplicou-se o teste “t” de *Student* nos resultados.

5.5 ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras comerciais de mel, coletadas no Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins (estados vizinhos ao Maranhão). Na Figura 14 é apresentado um esquema com o método proposto para a determinação de sulfonamidas em mel.

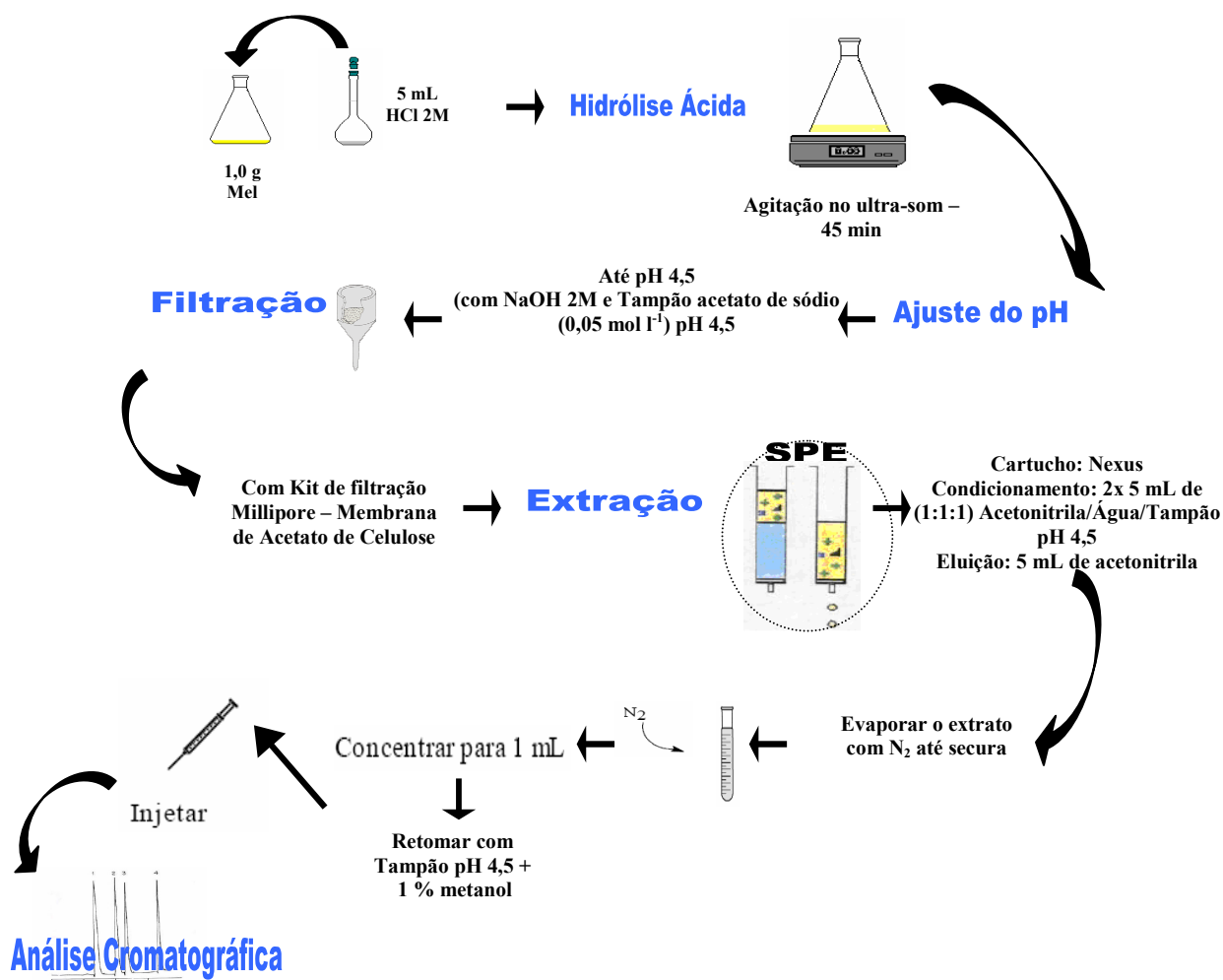


Figura 14 - Roteiro com as etapas para a análise de sulfonamidas em mel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por ZOTOU e VASILIAOUDOU [11] para a determinação de sulfonamidas em mel por HPLC-DAD que emprega solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6; como fase estacionária a coluna C18 e fase móvel: metanol e solução tampão acetato 0,05M, pH 3,6, com adição de 1% de ácido acético, no modo isocrático. Os autores realizaram testes de extração em fase sólida com vários cartuchos e solventes para eluição. Para a etapa de extração foi utilizado o método recomendado por MAUDENS *et al.* [63] como referência inicial, que utilizou hidrólise ácida com ácido clorídrico 2M e extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C18.

6.1 SELEÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA

Na Tabela 6 são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 300 nm para as sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram posteriormente selecionados na determinação analítica das sulfonamidas pelo método cromatográfico com detecção por arranjo de diodos. Os testes foram realizados com as sulfonamidas com concentração em 1 mg L⁻¹ em metanol.

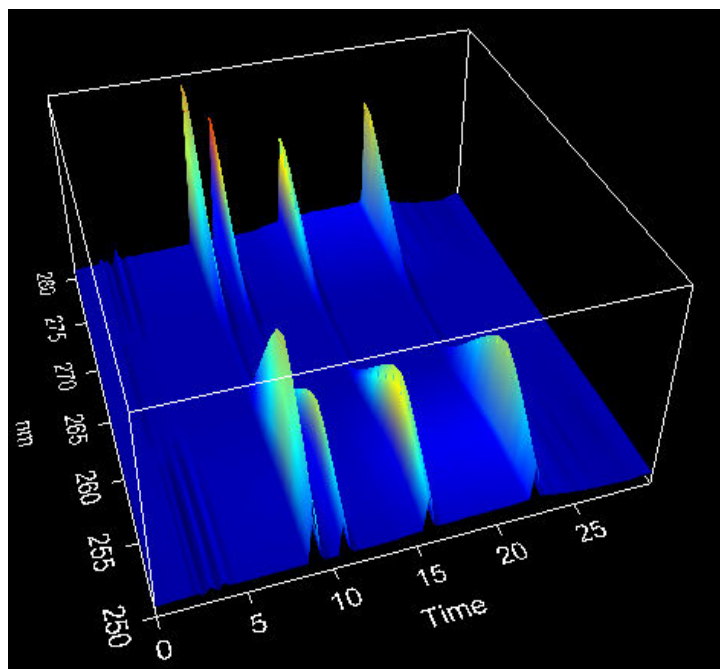
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda de absorção máxima das sulfonamidas estudadas.

Composto	λ máx (nm)
Sulfadiazina	270
Sulfadimetoxina	272
Sulfadimidina	269
Sulfatiazol	260

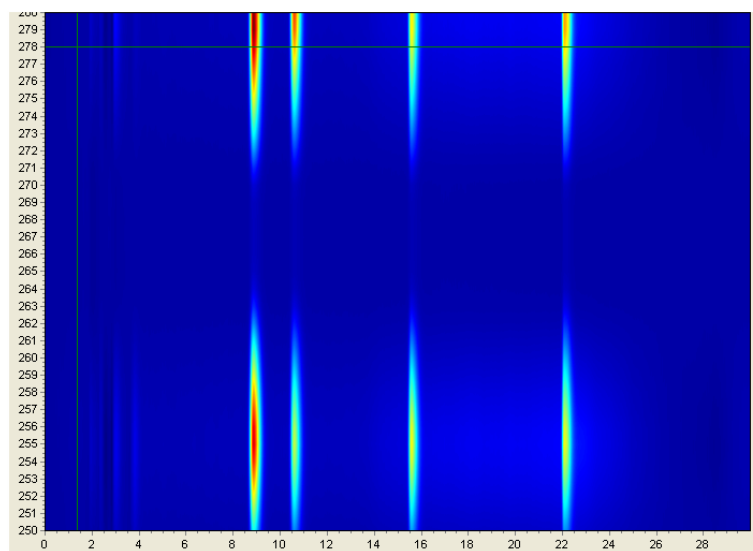
Nas Figuras 15 (a e b) e 16 (a e b) são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção na região do UV (250-280 nm) e os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda na região UV em estudo.

Os resultados encontrados em ambos os equipamentos confirmam o comprimento de onda de máxima absorção, 278 nm, para a sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e

sulfadimetoxina. Para sulfatiazol, embora a máxima absorção não ocorra em 278 nm, resultados satisfatórios foram obtidos neste comprimento de onda, justificando a escolha deste comprimento de onda para os quatro compostos em estudo.

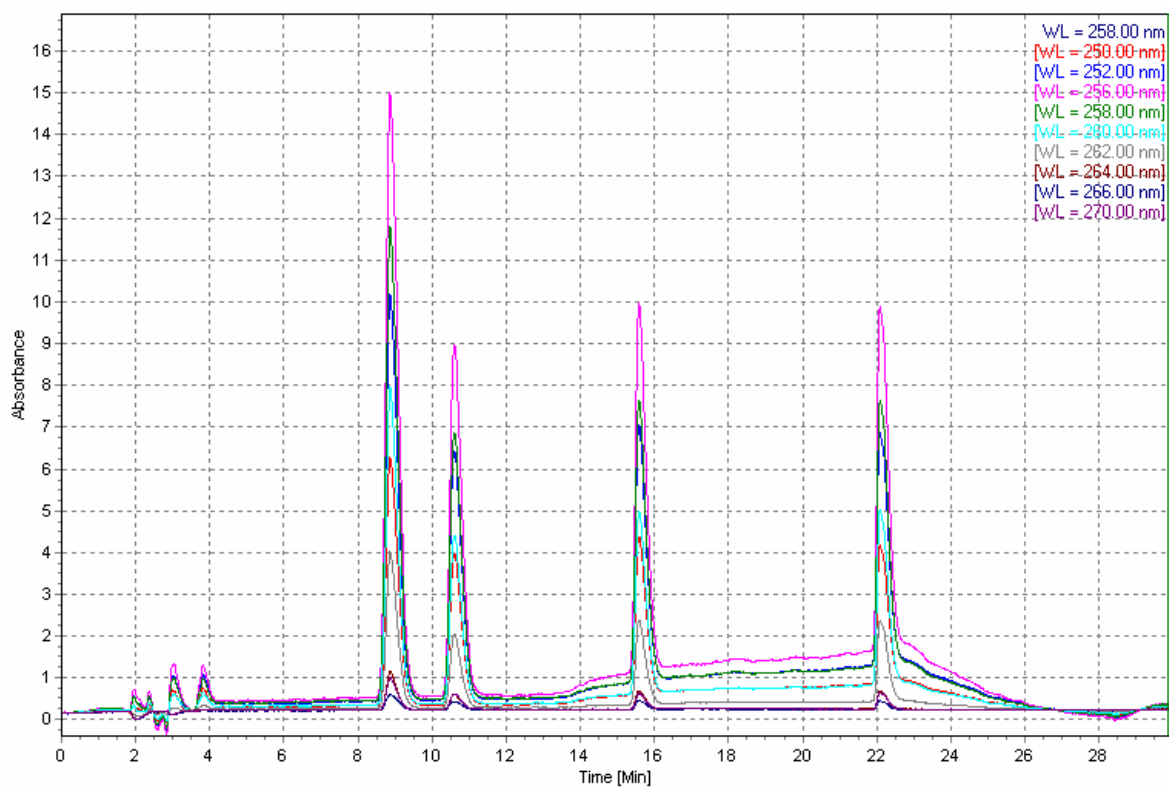


(a)

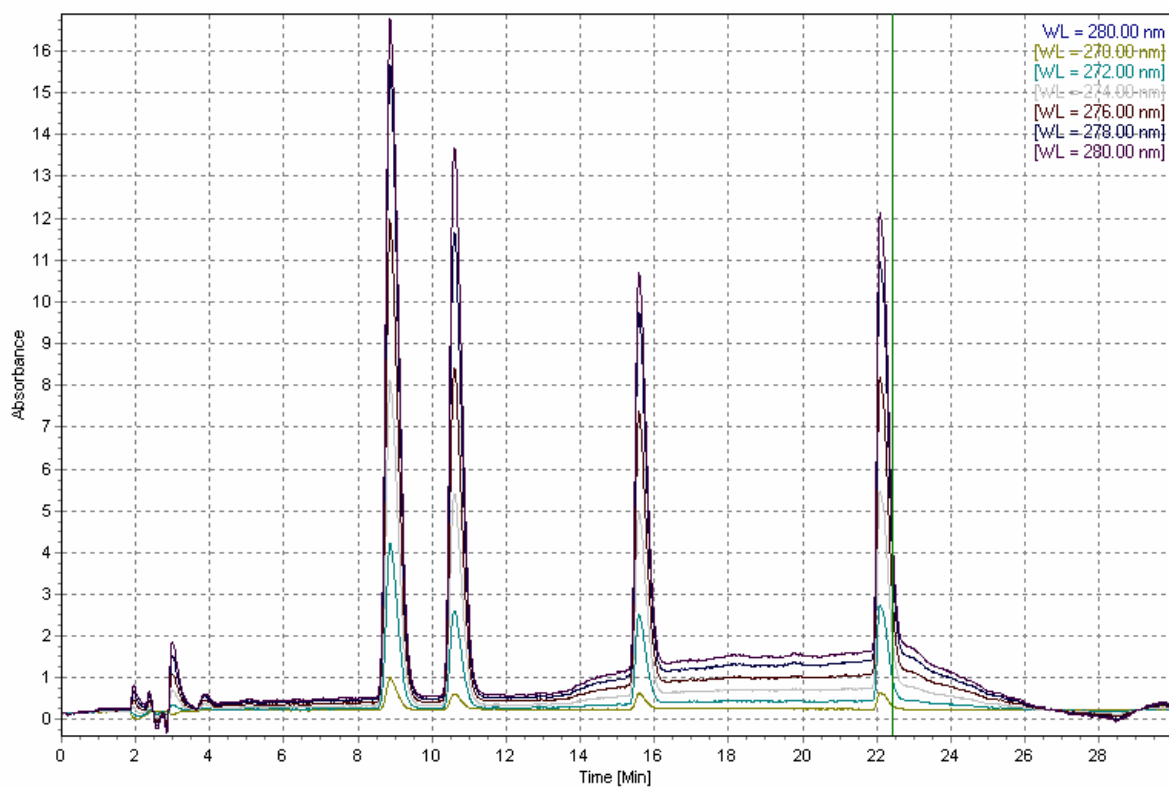


(b)

Figura 15 - Espectros de absorção na região do UV das sulfonamidas estudadas: (a) visualização em 3D e (b) visualização do espectro de maior resposta.



(a)



(b)

Figura 16 - Seleção dos comprimentos de onda através do detector do cromatográfico: (a) 250- 270 nm e (b) 270-280 nm

6.2 SELEÇÃO DA COLUNA

Para se obter uma melhor separação cromatográfica foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas duas colunas analíticas, uma com fase C_8 (mais polar), e com uma coluna C_{18} (menos polar). Com ambas as colunas obteve-se uma boa resolução e boa separação dos compostos de interesse. A Figura 17 mostra uma sobreposição dos cromatogramas resultantes da injeção da mistura dos padrões em concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Selecionou-se a coluna C_{18} em função dos maiores valores de áreas dos picos das sulfonamidas, confirmando-se os dados encontrados na literatura que citam maior utilização da coluna C_{18} .

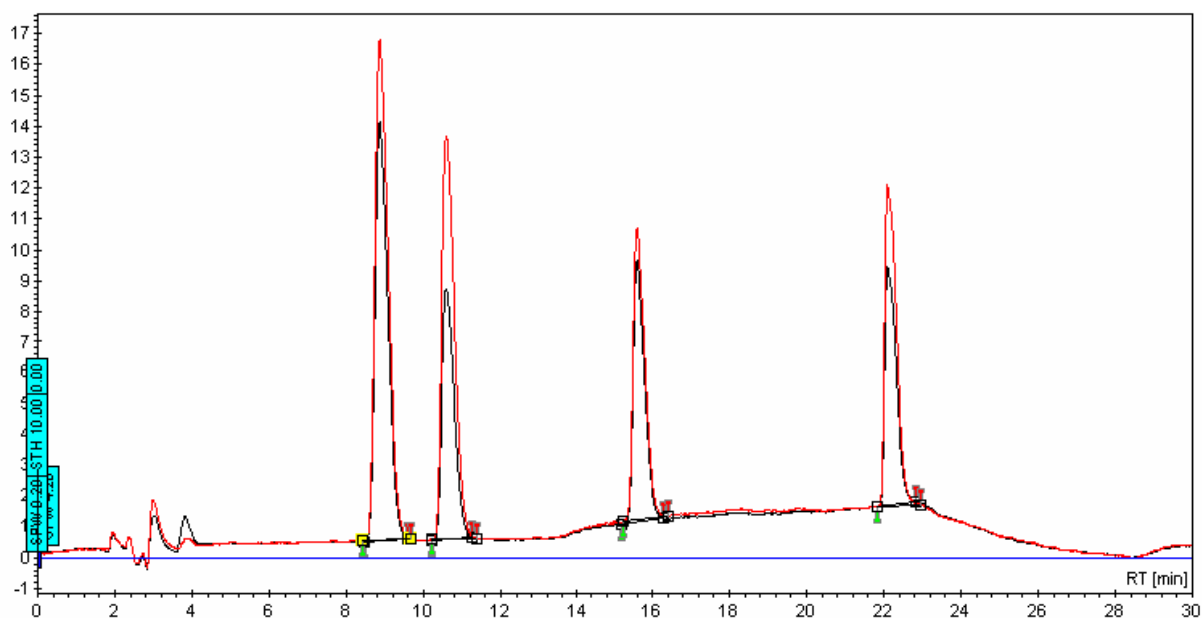


Figura 17 - Cromatogramas obtidos para uma mistura de padrões de sulfonamidas, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando C_{18} (cromatograma vermelho), C_8 (cromatograma preto) e pureza do sinal (azul).

6.3 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

A escolha da fase móvel é muito importante na separação dos analitos devido à interação que ocorre entre ambos. A fase móvel precisa ser selecionada de modo a proporcionar uma resolução adequada dos analitos, boa separação, menores tempos de

retenção, mantendo, entretanto, a solubilidade dos analitos no decorrer da separação cromatográfica e, principalmente, sem interferir na detecção dos analitos de interesse.

6.3.1 Seleção do pH da fase móvel

As sulfonamidas estudadas apresentam caráter anfótero (solubilidade entre 1 e 192 mg/100mL de água a 27°C) e valores de pK_a entre 6,21 e 7,45. Vários trabalhos na literatura apontam o uso de solução-tampão de acetato de sódio (pH 4,5) na fase móvel, justificando que seu uso mantém as espécies iônicas estáveis no decorrer das análises. A escolha do pH da solução-tampão constitui-se, então, em um fator importante. Foram feitos testes para verificar em qual pH as sulfonamidas estudadas teriam a melhor resposta no detector DAD. Os valores de pH testados foram: 3,5; 4,5 e 5,5, como apresentado na Figura 18. Para a realização dos testes de pH utilizou-se acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Em todos os valores de pH obteve-se boa separação e resolução. Entretanto, em pH 4,5 melhores resultados foram obtidos, quando se comparando as áreas dos picos nos três valores de pH.

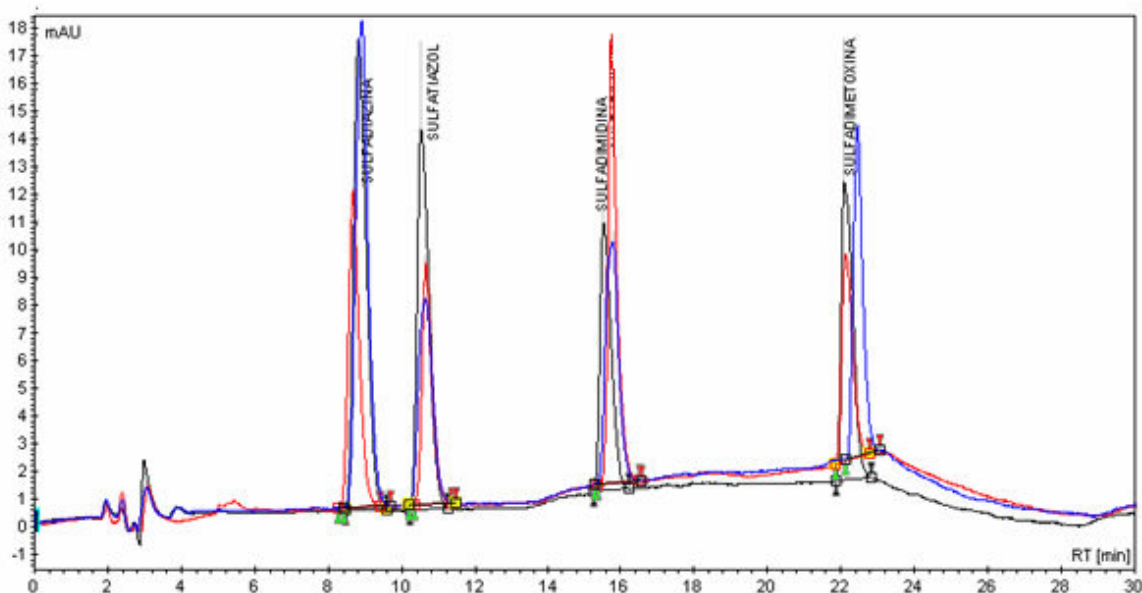


Figura 18 - Cromatogramas típicos, sobrepostos, obtidos para as sulfonamidas em diferentes valores de pH do tampão acetato de sódio: pH 3,5 (vermelho); pH 4,5 (azul) e pH 5,5 (preto)

6.3.2 Composição da fase móvel

No Quadro 4 são apresentados os testes realizados no estudo da composição da fase móvel.

Teste	Gradiente			Composição da Fase móvel	
	t (min)	%	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
Teste 1	0	10:90	1,0	Metanol	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 2	0	10:90	1,0	Metanol	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 3	0	10:90	1,0	Metanol	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 4	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Água
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 5	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Tampão acetato de sódio (0,05 molL ⁻¹) pH 4,5
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			
Teste 6	0	10:90	1,0	Acetonitrila	Solução aquosa de Ac. Acético 0,1%
	10	15:85			
	15	30:70			
	20	40:60			
	25	15:85			
	30	10:90			

*t – tempo em minutos; % - proporção de solvente

Quadro 4 - Testes para seleção da composição da fase móvel

Quando metanol foi empregado na fase móvel, independente da composição da fase aquosa, não foi possível observar todos os picos das sulfonamidas injetadas. Em todos os

testes em que foi utilizado este solvente, observou-se somente os picos da sulfadiazina, sulfatiazol e sulfadimidina, não sendo identificando sinal para sulfadimetoxina. Este fato pode ser explicado em função do poder de arraste do metanol, que não deve ter sido suficiente para detectá-la nas condições estabelecidas. Os resultados dos testes feitos com tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e solução de ácido acético 0,1% apresentaram áreas dos picos maiores que as obtidas quando utilizando água na fase móvel. Na Tabela 7 são apresentados a quantidade e os respectivos compostos separados no estudo da composição da fase móvel. Os cromatogramas típicos obtidos com os melhores resultados para cada teste de composição da fase móvel são apresentados nas Figuras 19, a e b.

Para os testes empregando-se acetonitrila, melhores resultados foram encontrados para todas as composições da fase móvel. Utilizando-se ACN: solução de ácido acético 0,1% e ACN: tampão acetato de sódio pH 4,5, resolução e separação adequadas foram observadas para as quatro sulfonamidas. Acetonitrila e água apresentaram melhores resultados sendo, assim, selecionados como os solventes adequados para a fase móvel (Figura 19 - b).

No ANEXO 03, são apresentados todos os cromatogramas dos testes realizados nos estudos da composição da fase móvel.

Tabela 7 – Estudo da composição da fase móvel.

Teste	Quantidade de compostos separados	Compostos separados
01 (MeOH:H ₂ O)	03	SDZ, STZ, SDD
02 (MeOH:TAMPÃO)	03	SDZ, STZ, SDD
03 (MeOH:ÁGUA ÁC 0,1%)	03	SDZ, STZ, SDD
04 (ACN:H ₂ O)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
05 (ACN:TAMPÃO)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM
06 (ACN: ÁGUA ÁC 0,1%)	04	SDZ, STZ, SDD, SDM

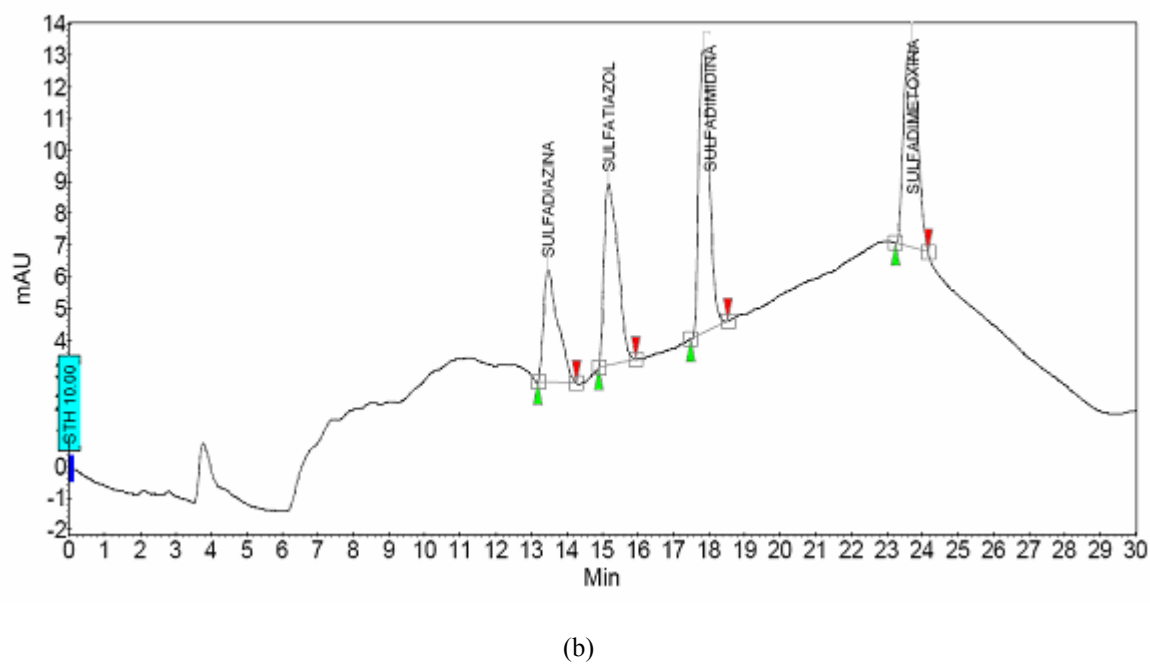
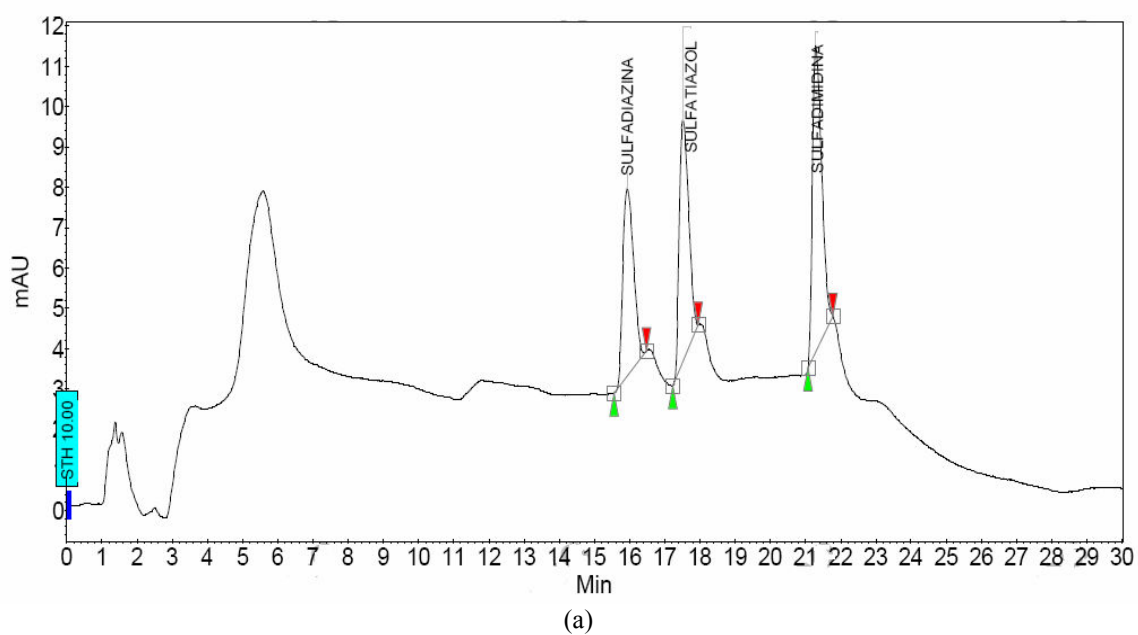


Figura 19 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Metanol: Tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) Fase: Acetonitrila:Água

6.3.3 Seleção do solvente para preparo das soluções de trabalho

As sulfonamidas são compostos ligeiramente solúveis em água, e apresentam maior solubilidade em soluções ácidas ou básicas e em solventes orgânicos [9]. Segundo Sun *et al.* [9], a solução de ácido acético 0,1% quando utilizada como solvente para as soluções de trabalho, proporciona picos cromatográficos mais definidos. Para Pecorelli *et al* [18], as soluções de trabalho devem ser preparadas usando-se solução tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5, uma vez que favorecem a estabilidade das sulfonamidas.

Para se obter resolução e separação cromatográfica adequadas foram testados dois solventes para o preparo das soluções de trabalho. Dois testes foram realizados, utilizando-se solução-tampão de acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,5 e utilizando-se solução de ácido acético 0,1%. Para ambos os solventes foram obtidos resultados satisfatórios, entretanto, a solução tampão (Figura 20) forneceu maiores áreas dos picos cromatográficos, tendo-se optado por este solvente para a realização das demais análises.

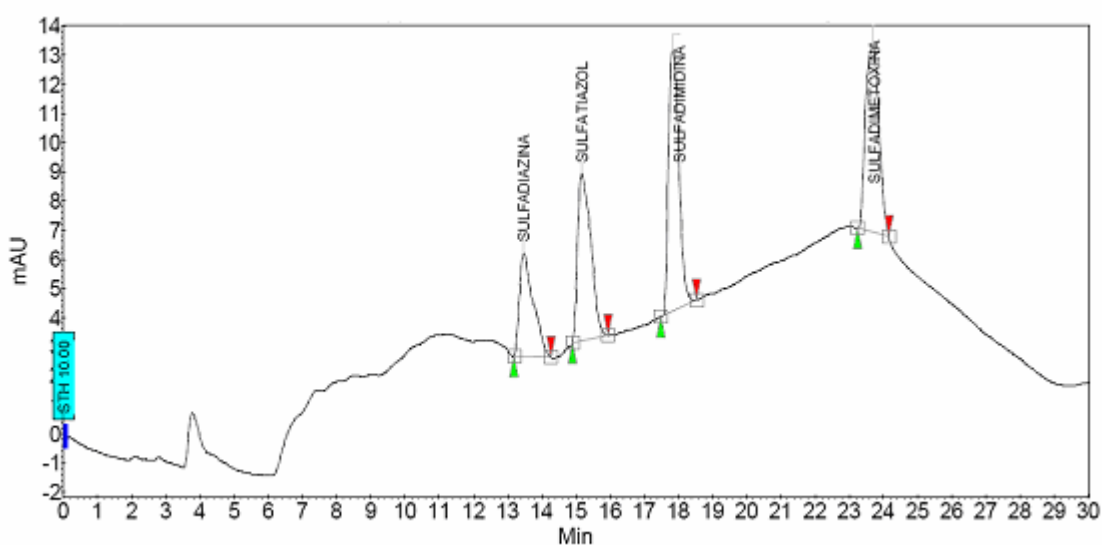


Figura 20 - Cromatograma típico obtido nos testes com diferentes solventes na preparação da solução de trabalho: solvente utilizado - tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5.

Outro teste realizado foi a otimização do tempo de análise. Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação e a resolução dos picos, o fluxo da fase móvel foi variado de $0,4$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados demonstraram que quanto menor o fluxo da fase móvel sulfadiazina e sulfatiazol apresentam tempos de retenção bem próximos dificultando a

separação dos picos. Em fluxos maiores ocorre uma melhor separação. O fluxo de 1 mL min⁻¹, apresentou os melhores resultados podendo-se observar separação dos picos satisfatória.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Depois de selecionadas as condições cromatográficas foram realizados cinco repetições em concentração 1,0 mg L⁻¹ para cada sulfonamida, com os melhores resultados dos testes anteriores. Na Tabela 8 são listadas as condições cromatográficas selecionadas. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido nestas condições.

Tabela 8 - Condições cromatográficas selecionadas para análise das sulfonamidas.

Item	Condições
Equipamento	CLAE-DAD
Coluna	CL-18, 150mm x 4,6mm, 4µm - Phenomenex
Coluna de Guarda	KJO-4282 – Phenomenex
Eluente A	Acetonitrila
Eluente B	Água
Proporção dos solventes	10:90
(A:B)	15:85
	30:70
	40:60
	15:85
	10:90
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	278 nm

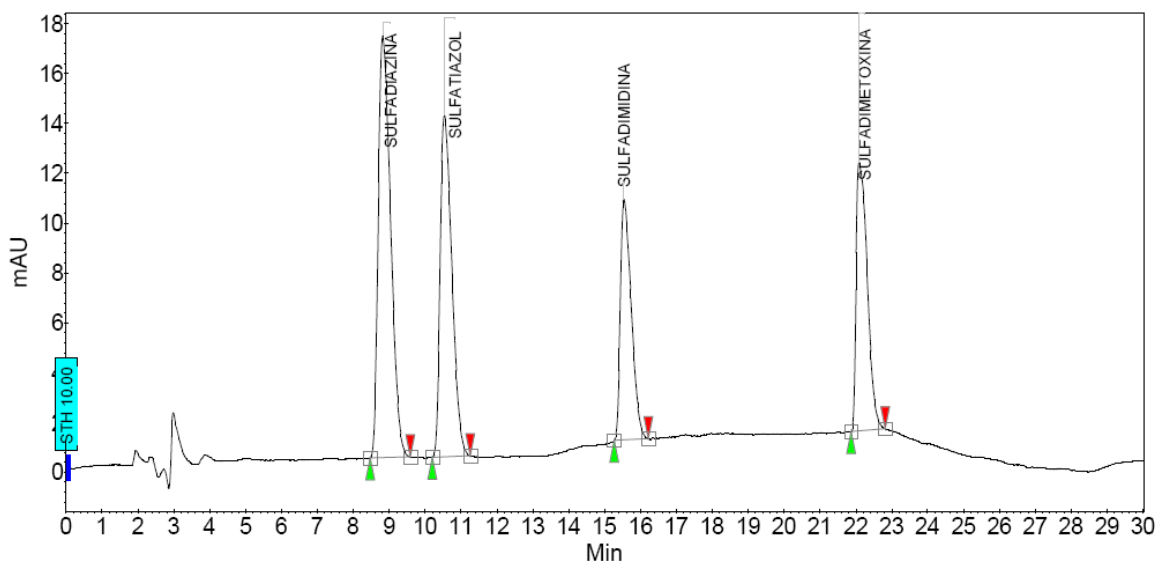


Figura 21 - Cromatograma das quatro sulfonamidas por CLAE-DAD nas condições experimentais otimizadas, a concentração dos analitos foi de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

A estabilidade dos padrões também foi avaliada nesta etapa. A avaliação da estabilidade das soluções intermediárias utilizadas na metodologia analítica foi realizada com o objetivo de verificar a ocorrência de degradação do analito. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos padrões durante a estocagem a -10°C em um período de 3 meses. As amostras foram analisadas após 1 semana, 1, 2 e 3 meses. Definiu-se como critério de aceitação variações menores que 20% em relação à concentração inicial, levando-se em consideração possíveis alterações ocasionadas pelo próprio armazenamento.

Verificou-se que a estabilidade dos padrões é mantida por até 3 meses e 7 dias, após esse período a concentração dos padrões sofre uma perda média do analito de aproximadamente 40 %. A Figura 22 apresenta um gráfico com a percentagem de degradação das soluções-padrão.

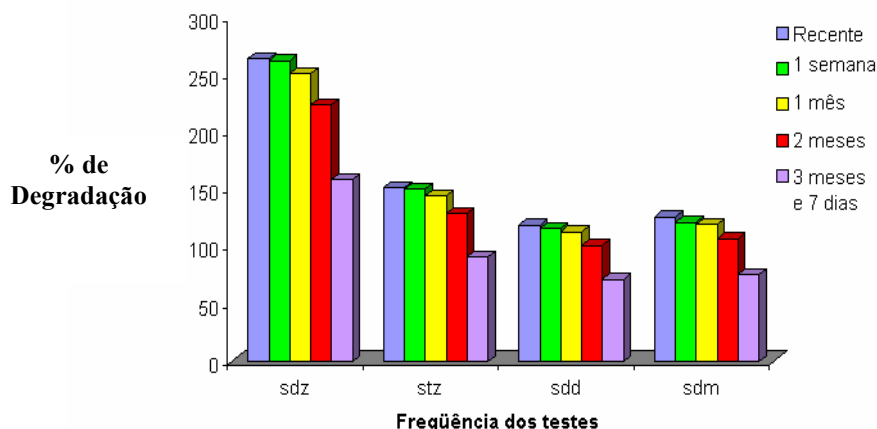


Figura 22- Estudo da degradação das soluções-padrão

6.5 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR EFS

A metodologia de extração utilizada neste trabalho baseou-se em estudos de; SUN *et al.* [9]; BISWAS *et al.* [71]; WANG *et al.* [67]; ZOTOU e VASILADOU [11]; MAUDENS, ZHANG E LAMBERT [63]; PECORELLI *et al.* [18]; MARTEL e ZEGANNE [64]; PANG *et al.* [65]; CANCHO-GRANDE *et al.* [116]; FURUSAWA [14]; STOEV & MICHAILOVA [80]; VIÑAZ *et al.* [86]; HORIE *et al.* [66].

Os testes foram realizados utilizando-se extrato de mel, preparado pela diluição de 1,0 g de mel em água + solução-tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (amostra sem hidrólise ácida) e extrato hidrolisado de mel (1,0 g de mel + solução de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}). Foram utilizados volumes de 100,0 mL de amostras fortificadas com as sulfonamidas de interesse. Para os testes preliminares utilizou-se nível de fortificação de 50 ng g^{-1} de cada sulfonamida. A extração foi realizada em triplicata e as injeções cromatográficas também foram feitas em triplicata. Avaliou-se a recuperação de cada composto após os procedimentos de extração, comparando-se com a injeção, direta dos padrões das sulfonamidas. Uma vez estabelecidas as condições, novos testes foram realizados, utilizando-se três níveis de fortificação (25 , 50 e 100 ng g^{-1}).

6.5.1 Pré-tratamento da amostra

Em síntese, podemos definir o mel como um produto açucarado, constituído em sua maioria por açúcares. As sulfonamidas têm como característica formarem ligações com açúcares, principalmente ligações com açúcares redutores, podendo formar uma variedade de diferentes compostos açúcar-sulfonamida [114] o que poderia modificar o comportamento dos picos cromatográficos pelo efeito de matriz. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre açúcar e sulfonamida, estudada por Sheth *et al.* [114]. No citado estudo, realizou-se uma reação de uma molécula de sulfatiazol com uma molécula de açúcar redutor, ocorrendo a formação de uma base de Schiff (n-glucosilamina) e liberação de uma molécula de água, formando-se em seguida um composto de Amadori e, após um longo período de armazenamento, o autor comenta a possibilidade de formação de outros produtos da reação de Maillard. O referido autor cita também que sobre condições ácidas a tendência é a formação de sulfonamidas livres devido a ionização do grupo amina. O autor ainda afirma que a ligação de açúcares-sulfatiazol poderá ocorrer com outras sulfonamidas também.

Schwaiger e Schuch [115] estudaram e provaram que para a determinação de sulfonamidas em mel é necessário uma etapa de hidrólise ácida antes da análise cromatográfica para quebrar as ligações açúcar-sulfonamida. Observaram também que após a hidrólise ácida é necessário realizar um ajuste no pH do meio para 4,5 para que as sulfonamidas permaneçam estáveis no meio.

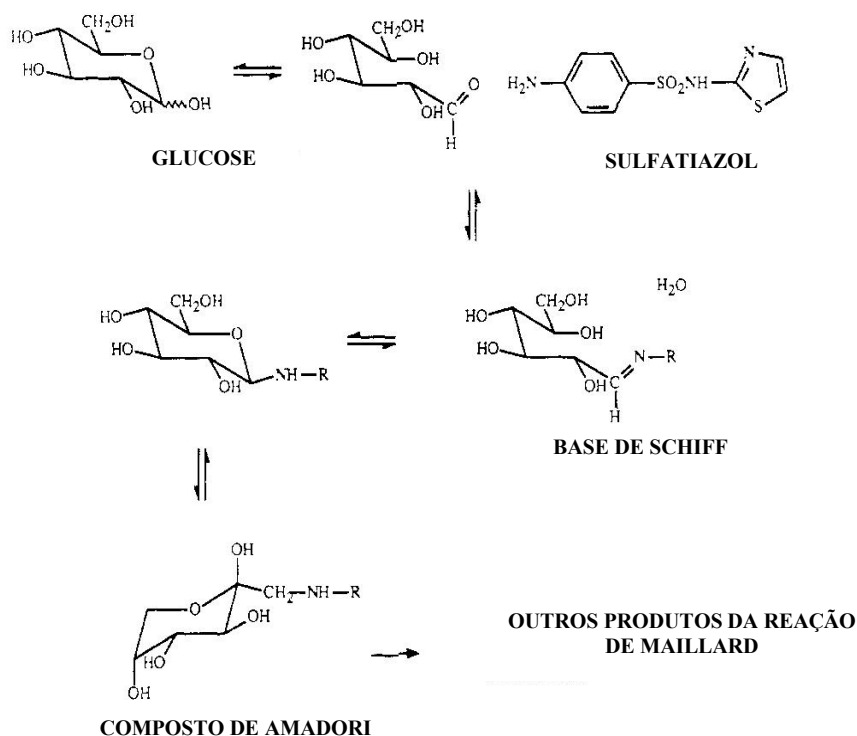


Figura 23 – Esquema da reação açúcar-sulfonamida.
 Fonte: adaptado de [114].

Inicialmente foram realizados testes para selecionar as melhores condições para o pré-tratamento da amostra. Na Tabela 9 são apresentados os testes realizados.

Tabela 9 – Testes realizados para seleção das condições para o pré-tratamento da amostra

Teste	Conc. de ácido	Volume de ácido	Forma de agitação	Tempo de agitação
01	1 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
02	1 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
03	1 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
04	1M	5 mL	Mesa agitadora	45 min
05	2 M	2 mL	Banho ultra-som	30 min
06	2 M	2 mL	Mesa agitadora	45 min
07	2 M	5 mL	Banho ultra-som	30 min
08	2M	5 mL	Mesa agitadora	45 min

Após definidas as condições para a hidrólise foram realizados dois testes com a matriz. O primeiro consistiu somente na diluição de 1,0 g de mel em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,5, neste caso não utilizou-se hidrólise ácida. O segundo teste consistiu na realização de uma etapa de hidrólise ácida com ácido clorídrico, como descrito na seção 5.3.2.1. Os resultados dos testes de hidrólise mostraram que as variáveis que mais influenciam na eficiência da hidrólise ácida são concentração e volume de ácido adicionado e tempo de agitação. A forma de agitação influencia, mas não como as outras variáveis. A concentração do ácido mostrou ser uma variável muito importante, sendo a concentração de 2M a mais eficiente. O volume de ácido adicionado influencia tanto na dissolução quanto na eficiência da hidrólise. O tempo de agitação também está diretamente ligado à eficiência da hidrólise. O conjunto de condições: concentração de 2M e tempo de 30 minutos, apresentou bons resultados, mas não melhores dos que os apresentados na mesma concentração e tempo de 45 minutos.

Das condições estudadas, os melhores resultados foram os obtidos pelo seguinte conjunto: concentração de 2M, 2 mL de ácido e 45 min. O volume de 2 mL propiciou melhores resultados, no entanto, dificulta a dissolução do mel, tendo-se optado pela adição de volume de 5 mL. A agitação em banho ultra-som foi escolhida por apresentar resultados um pouco melhores do que os encontrados com o uso da mesa agitadora. Nas Figuras 24 - a e b, são apresentados os cromatogramas correspondentes a este teste. Pode-se observar através das Figuras que sem hidrólise do mel ocorreram muitos ruídos, porém a evidência mais importante é que não foram observados os picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas de interesse. Na amostra testemunha fortificada foram observados vários picos interferentes em tempos de retenção próximos aos dos picos das sulfonamidas de interesse. A

ocorrência destes picos cromatográficos pode ocasionar diminuição nas áreas dos picos cromatográficos das sulfonamidas de interesse o que pode levar a resultados errados. Na Figura 24 b é apresentado um cromatograma típico de uma amostra de testemunha fortificada sem passar por uma etapa de hidrólise ácida.

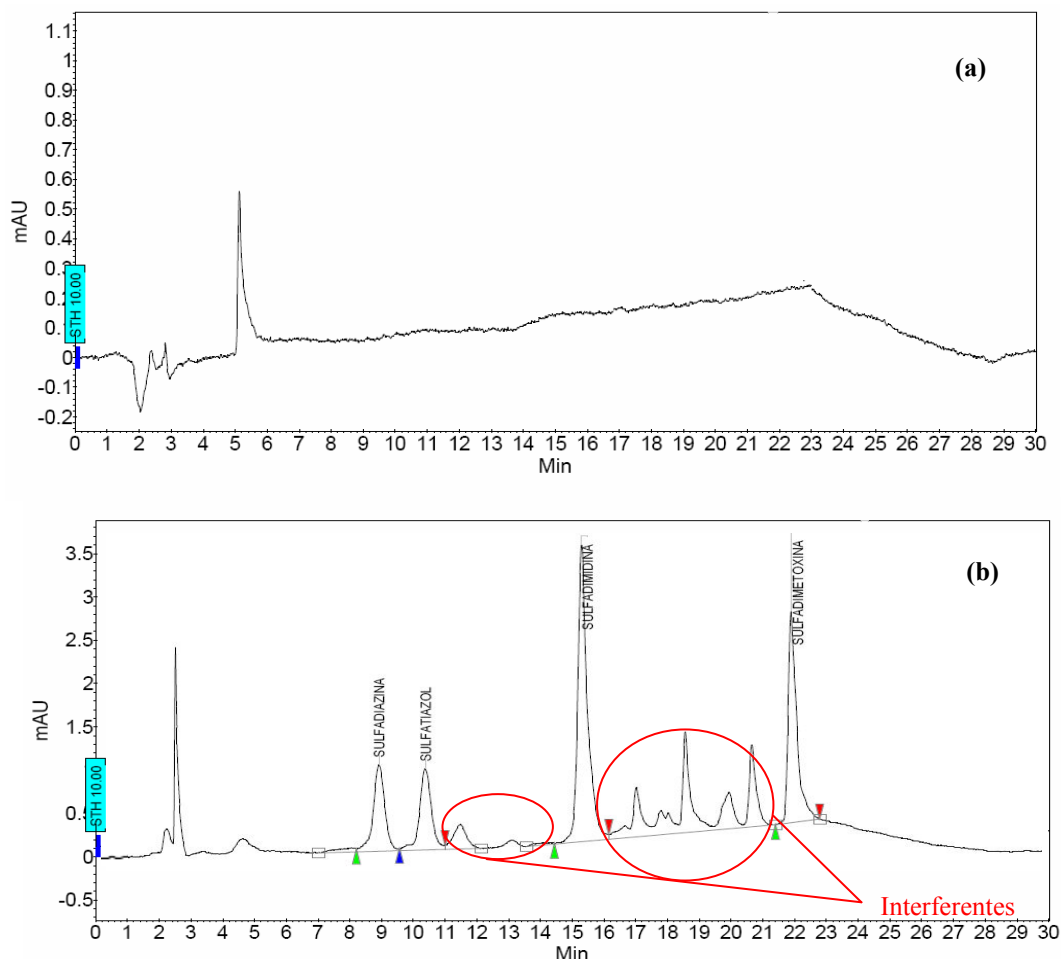


Figura 24 - Cromatogramas obtidos no teste de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha sem hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹, sem hidrólise ácida.

De um modo geral, todos os testes de hidrólise mostraram-se etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. Para o mel submetido à etapa de hidrólise ácida, foi possível perceber melhora do ruído no cromatograma, não sendo também observados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Os melhores resultados são mostrados nas Figuras 25 - a e b.

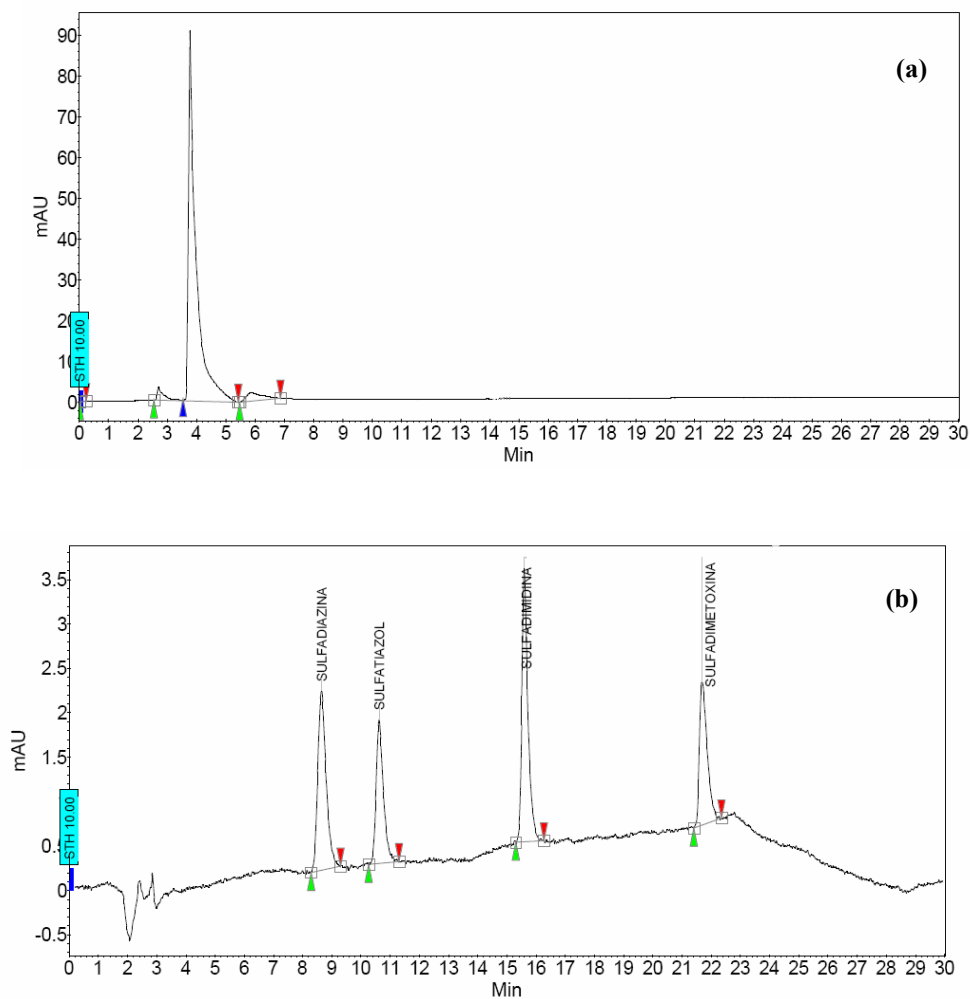


Figura 25 - Cromatogramas obtidos nos testes de pré-tratamento da amostra - (a) amostra testemunha com hidrólise ácida e (b) amostra testemunha fortificada, no nível de fortificação de 50 ng g^{-1} , com hidrólise ácida.

Pode-se evidenciar por este estudo a importância da etapa de hidrólise ácida, observando-se no cromatograma sem hidrólise a presença de vários picos interferentes próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, o que levou a uma redução das áreas dos picos dos compostos. Com a amostra de mel submetida à hidrólise ácida o cromatograma quase não evidenciou interferentes, tendo apresentado separação adequada dos picos das sulfonamidas.

6.5.2 Seleção do adsorvente, solvente para condicionamento e solvente para eluição dos analitos para a extração por fase sólida

Os testes realizados para escolha do adsorvente, solvente para condicionamento do cartucho e solvente para eluição tiveram por objetivo escolher o conjunto de condições que oferecessem a melhor eficiência na extração, ou seja, os melhores resultados de recuperação. As recuperações obtidas na extração de compostos nos níveis de concentração estudados deve ser entre 70-120%. As fases e condições utilizadas nas extrações são citadas na Tabela 10.

Cabe mencionar, que a eficiência da extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na amostra de mel fortificada em relação ao analito em solução padrão.

Tabela 10 - Condições para o teste de eficiência da extração (% recuperação)

Teste	Cartucho	Condicionamento
Teste 1	C-8	MA/MAT/AA/AAT*
Teste 2	C-18	MA/MAT/AA/AAT
Teste 3	Nexus	MA/MAT/AA/AAT

***MA – metanol: água; MAT – metanol:água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5; AA – acetonitrila:água; AAT – acetonitrila: água:tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5.**

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos testes de eficiência de extração. Quando metanol foi utilizado como solvente de eluição recuperações inferiores a 70% foram obtidas.

Tabela 11 - Resultados dos testes de eficiência de extração

Analito	Eluente	Eficiência da extração (% de recuperação)											
		C8 (teste 1)				C18 (teste 2)				Nexus (teste 3)			
		MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT	MA	MAT	AA	AAT
SDZ	MeOH	42	41	49	48	53	64	56	60	57	60	62	65
	ACN	61	67	65	70	66	70	68	73	73	79	80	84
	Tampão	58	62	61	62	67	73	70	76	73	77	79	83
STZ	MeOH	39	45	40	48	55	51	51	56	51	58	56	59
	ACN	56	60	55	65	62	64	63	71	60	67	75	84
	Tampão	51	60	55	60	55	63	66	70	62	66	68	76
SDD	MeOH	42	45	44	47	55	61	64	63	53	60	53	63
	ACN	60	65	62	66	63	68	67	66	72	76	74	79
	Tampão	62	64	63	57	66	72	74	68	64	69	70	78
SDM	MeOH	43	47	42	45	51	59	54	61	55	58	52	61
	ACN	60	63	62	67	70	64	67	63	73	76	66	79
	Tampão	55	58	56	58	72	75	74	78	71	74	78	82

Analisando-se os resultados da Tabela 11, observa-se que os cartuchos Nexus proporcionaram recuperações, de 51 a 65%, em todos os tipos de condicionamento realizados. Para os cartuchos C18, as recuperações variaram entre 51-64%. Com cartucho C8 menores recuperações foram obtidas de 41-49%, supondo-se problemas com a polaridade da fase.

Dos condicionamentos testados, os solventes acetonitrila/água/tampão foram os que apresentaram melhores resultados para todos os cartuchos. A utilização de tampão no condicionamento proporcionou melhores resultados. Os solventes metanol/água foram a sequência que apresentaram menores valores de recuperação.

Para a eluição, verificou-se que, com acetonitrila, as recuperações foram melhores dos que as obtidas quando metanol foi utilizado como solvente de eluição dos analitos. As recuperações encontradas foram de 51-84%. Analisando-se os resultados dos testes utilizando-se acetonitrila como eluente, observou-se que com cartuchos Nexus, melhores recuperações foram também obtidas (60-84%). O cartucho C18 também apresentou resultados satisfatórios (62 a 73%). Para o cartucho C8, menores recuperações (55-70%) foram obtidas.

As extrações utilizando tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹), pH 4,5 e adição de 1% de metanol como eluente para os analitos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados com acetonitrila. As recuperações para os cartuchos Nexus foram de 62-83%. Já

para o cartucho C18 foram de 55-79% e para o cartucho C8 as recuperações foram de 51-62%.

Com base nos resultados encontrados, quanto ao material que constitui a fase sólida do cartucho, pode-se observar que o cartucho Nexus apresentou uma maior interação com as moléculas dos analitos dos que as fases sólidas C8 e C18 obtendo-se melhores resultados em todos os testes. Os resultados dos testes realizados com os cartuchos C8 não foram satisfatórios para nenhuma das condições testadas. Pressupõe-se que a polaridade da fase possa ter interferido na extração. E como eluente a acetonitrila apresentou os melhores resultados, incluindo secagem mais rápida sob fluxo suave de nitrogênio.

Objetivando-se promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes também foram realizados dois testes de *clean-up*, ambos utilizando-se cartuchos de *Florisil*, 500 mg/6mL. O primeiro teste (*clean-up* 1) foi realizado com 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila e o segundo teste (*clean-up* 2) foi realizado com 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após a passagem das amostras pelos cartuchos de *Florisil*, submeteu-se a fluxo suave de nitrogênio até a secura. As amostras foram retomadas com 1 mL de acetonitrila e injetadas. A Figura 26 apresenta os resultados dos testes de % de recuperação das quatro sulfonamidas estudadas com as duas condições de *clean-up* testadas.

Dentre os procedimentos empregados, o que demonstrou maior recuperação do analito foi o que empregou 5 mL de tampão acetato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5 e 5 mL de acetonitrila. No entanto, estes resultados não foram melhores do que os obtidos quando não realizado procedimento de *clean up* com cartuchos de *Florisil*, optando-se, portanto pela não utilização deste passo nas demais análises para a determinação de sulfonamidas em mel.

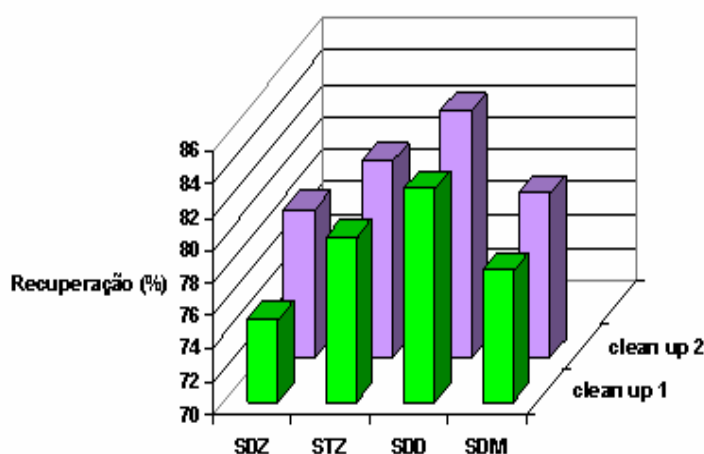


Figura 26 - Porcentagens de recuperação das sulfonamidas após utilização de uma etapa de *clean-up*.

Depois de selecionadas todas as condições de extração, foram realizados novos experimentos de extração, em triplicata, em três níveis de concentração: 25, 50 e 100 ng g⁻¹ para otimizar as condições de extração do método desenvolvido. Na Tabela 12 são apresentados os resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração selecionadas.

Tabela 12 – Resultados dos testes de estabelecimento (otimização) das condições de extração.

Composto	Concentração		
	25 ng/g	50 ng/g	100 ng/g
SDZ			
Rec±RSD, (%)	80 ± 12,50	83 ± 8,43	85 ± 5,88
STZ			
Rec±RSD, (%)	71 ± 15,49	76 ± 11,84	80 ± 7,50
SDD			
Rec±RSD, (%)	77 ± 12,99	81 ± 9,88	83 ± 6,02
SDM			
Rec±RSD, (%)	75 ± 13,33	79 ± 10,13	81 ± 6,17

*n=3

Na Figura 27 é apresentado o cromatograma no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹ obtido após estabelecimento das condições de extração.

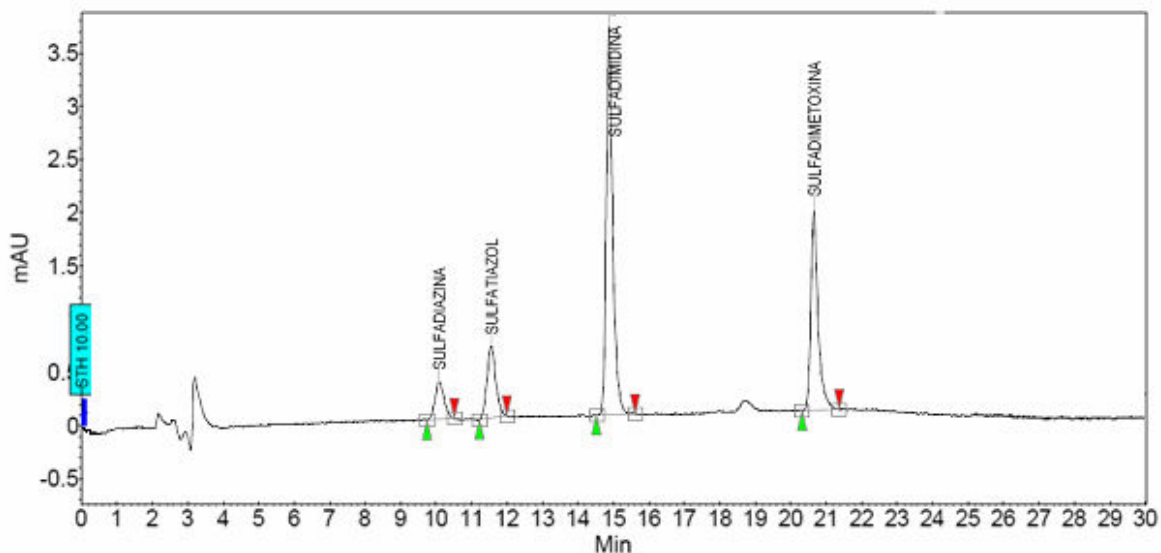


Figura 27 - Cromatograma obtido após o procedimento de extração otimizado, no nível de fortificação de 50 ng g⁻¹

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Depois de estabelecidas e otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica, como no preparo da amostra para a determinação das sulfonamidas por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos de sulfonamidas no mel. Antes da validação, verificou-se a conformidade do sistema seguindo as recomendações da *Food and Drug Administration* – FDA, 2004.

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

6.6.1 Conformidade do sistema

Os parâmetros da conformidade do sistema avaliados: número de pratos (N), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As), estão de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas vigentes e foram obtidos satisfatoriamente. Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos dos parâmetros para verificação da conformidade do sistema cromatográfico.

Tabela 13 - Valores obtidos para a conformidade do sistema cromatográfico

Sulfonamidas	t _R	N	k	Rs ^(*)	As
SDZ	8,45	8002,23	1,6	3,0	1,04
STZ	10,33	8710,16	2,8	6,74	1,25
SMZ	15,24	12014,63	3,4	8,44	1,20
SDM	22,09	26853,47	4,0	11,41	1,00

t_R – tempo de retenção das sulfonamidas; N – número de pratos teóricos; k – fator de retenção; Rs – resolução; As – fator de assimetria

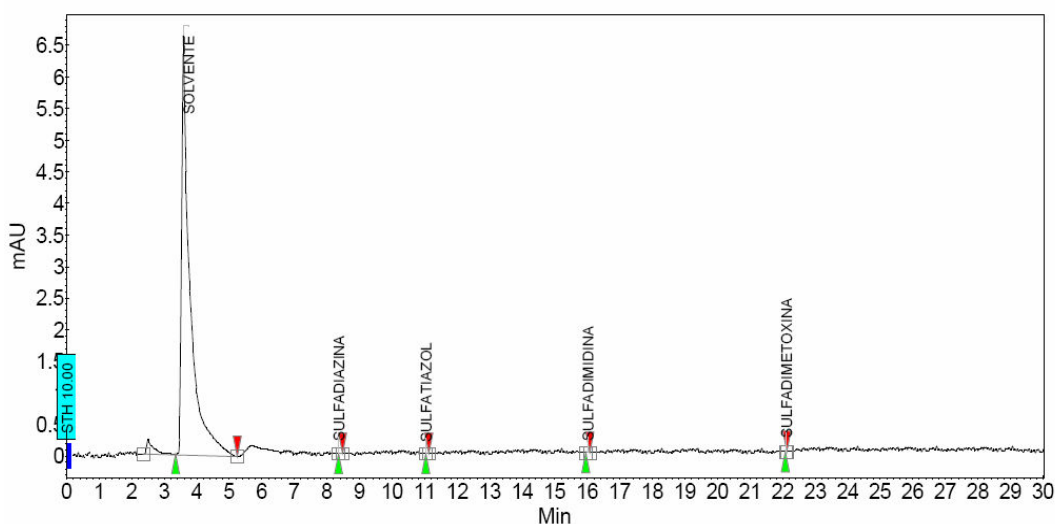
(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes.

Considerando-se as condições citadas por SHABIR [113]: $1 \leq k \leq 10$; $Rs > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

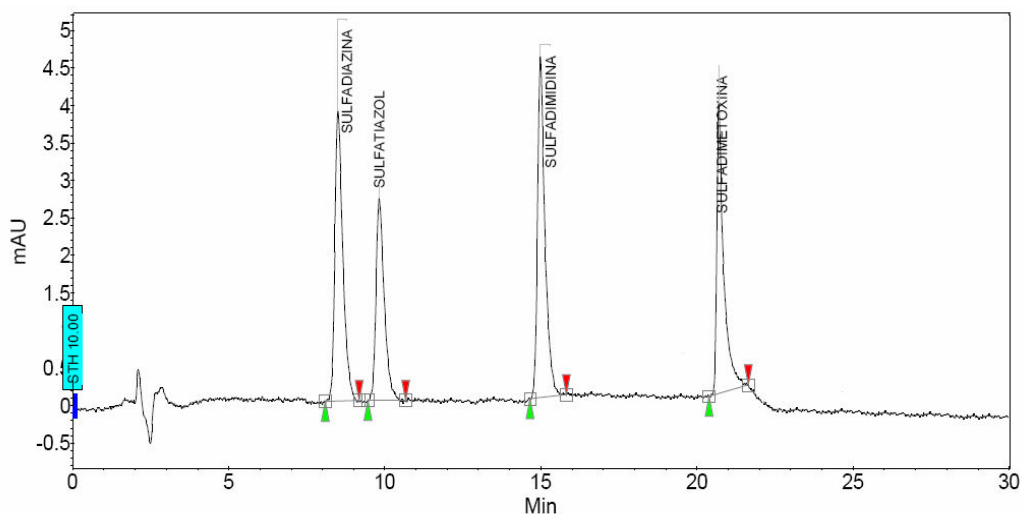
6.6.2 Seletividade

O estudo da seletividade do método teve como objetivo quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no mel. A seletividade foi testada analisando-se o extrato da amostra testemunha (extrato contendo só mel) e o extrato da amostra testemunha fortificado com as sulfonamidas (extrato contendo mel fortificado com as sulfonamidas).

No extrato da amostra testemunha não foram observados picos interferentes referentes aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo, durante toda a separação cromatográfica. Foram observados apenas sinais característicos do solvente. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28 - a e b.



(a)



(b)

Figura 28 - Cromatogramas das amostras utilizadas no estudo da seletividade: (a) amostra testemunha e (b) amostra testemunha fortificada.

Segundo a ANVISA não são recomendados que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito sejam superiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação. Como verificado na Figura 31, não existem picos interferentes, conclui-se, portanto, que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

6.6.3 Curva analítica

Foram construídas curvas analíticas, com soluções-padrão. As curvas analíticas com os padrões foram feitas com cinco injeções sucessivas (em quintuplicata), de cada ponto das curvas (25, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$), sempre da menor para a maior concentração, sendo utilizada a média das leituras para a construção das curvas.

As curvas foram construídas plotando-se a área do pico *versus* a concentração do analito (Figura 29), onde y é a resposta em unidades de área e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

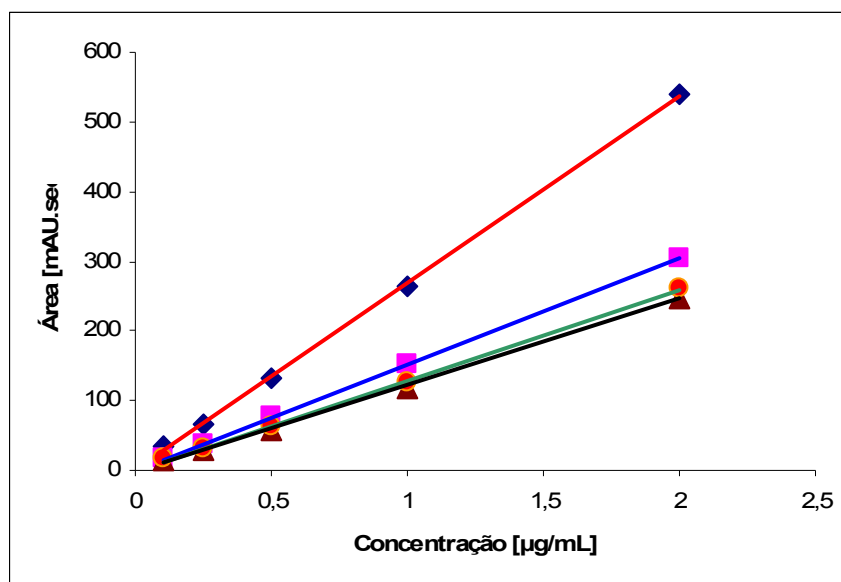


Figura 29 – Curvas analíticas: SDZ (vermelho), STZ (azul), SDD (verde) e SDM (preto).

Os valores das leituras foram submetidos a tratamentos estatísticos para obtenção dos coeficientes de correlação (r^2) e as equações das retas de cada sulfonamida pela extrapolação dos dados com o uso do *software Origin 6.0* e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Equações das retas e coeficientes de correlação das curvas analíticas com as soluções-padrão

Sulfa	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação de regressão	Coeficiente de correlação (r^2)
SDZ	0,025-2,0	$3,5754x - 0,021$	0.9990
STZ	0,025-2,0	$2,9936x - 0,043$	0.9996
SDD	0,025-2,0	$2,3462x - 0,019$	0.9994
SDM	0,025-2,0	$2,2321x - 0,063$	0.9983

Os coeficientes de correlação encontrados, todos superiores a 0,9900, demonstraram que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração estudado. Os resultados encontrados estão de acordo com as recomendações da ANVISA [58] para a validação de métodos analíticos.

6.6.4 Faixa linear, linearidade, sensibilidade

Para todo método existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,9900. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

A linearidade da resposta foi determinada através da habilidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear.

A sensibilidade foi estudada como a resposta do detector em função da concentração do analito, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

6.6.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das soluções-padrão das sulfonamidas em concentração decrescentes. Os limites de

detecção e quantificação foram calculados através das relações sinal/ruído. Na Tabela 15 são apresentados os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação.

6.6.6 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g⁻¹). O nível de fortificação utilizado nesta pesquisa baseou-se no LMR estabelecido pelo PNCR, do MAPA.

Tabela 15 - Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Parâmetros	SDZ	STZ	SDD	SDM
Faixa linear (µg mL ⁻¹)	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0	0,025-2,0
Sensibilidade (µau mL µg ⁻¹)	-0,021	- 0,043	-0,019	-0,063
Linearidade (r ²)	0.9990	0.9996	0.9994	0.9983
Precisão intra-ensaio (%RSD) n=5	2,84	5,24	4,31	3,01
Precisão inter-ensaio (%RSD) n=5				
25 ng g ⁻¹	12,99	11,11	12,65	10,81
50 ng g ⁻¹	5,81	8,64	7,14	6,02
100 ng g ⁻¹	3,41	4,88	3,49	3,57
LD (ng mL ⁻¹)	20	25	30	30
LQ (ng mL ⁻¹)	66	75	90	90

6.6.6.1 Precisão

Segundo o INMETRO [95] a precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Nesta pesquisa a precisão intra-ensaio foi avaliada mediante a análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, de duas amostras de mel fortificadas até a concentração de 100 ng g^{-1} . O RSD para todas as sulfonamidas ficou na faixa de 2,84 a 5,81% (Tabela 15). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de mel fortificadas em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}) em três dias diferentes, em quintuplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todas as sulfonamidas foi na faixa de 3,41 a 12,99% (Tabela 15).

Para a ANVISA [58] os intervalos de desvio padrão relativo (RSD) são considerados adequados se valores até 20% forem encontrados. Como todos os valores de RSD mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto pode ser considerado preciso.

6.6.6.2 Exatidão

A exatidão é medida com relação ao quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra [104], representado pelos valores das recuperações.

Foram realizados dois testes de recuperação, um utilizando apenas um nível de fortificação (100 ng g^{-1}) e um outro utilizando três níveis de fortificação (25, 50 e 100 ng g^{-1}). Para os testes de recuperação realizados em um mesmo dia, mesmo equipamento e mesmo analista, as recuperações variaram na faixa de 83 a 89,3%, estes resultados se encontram de acordo com os valores estipulados pela ANVISA [58], confirmando a exatidão do método.

As recuperações médias das sulfonamidas nos três níveis de fortificação avaliados de 74 a 88 %. Os menores valores de recuperação foram obtidos para o menor nível de fortificação, 25 ng g^{-1} , sendo de 72% e, proporcionalmente, a melhor recuperação foi encontrada para o maior nível de fortificação, 100 ng g^{-1} (88%). Dentre as quatro sulfonamidas estudadas, a sulfadiazina foi a que apresentou os melhores resultados em todos os níveis de fortificação (77, 86 e 88%, respectivamente).

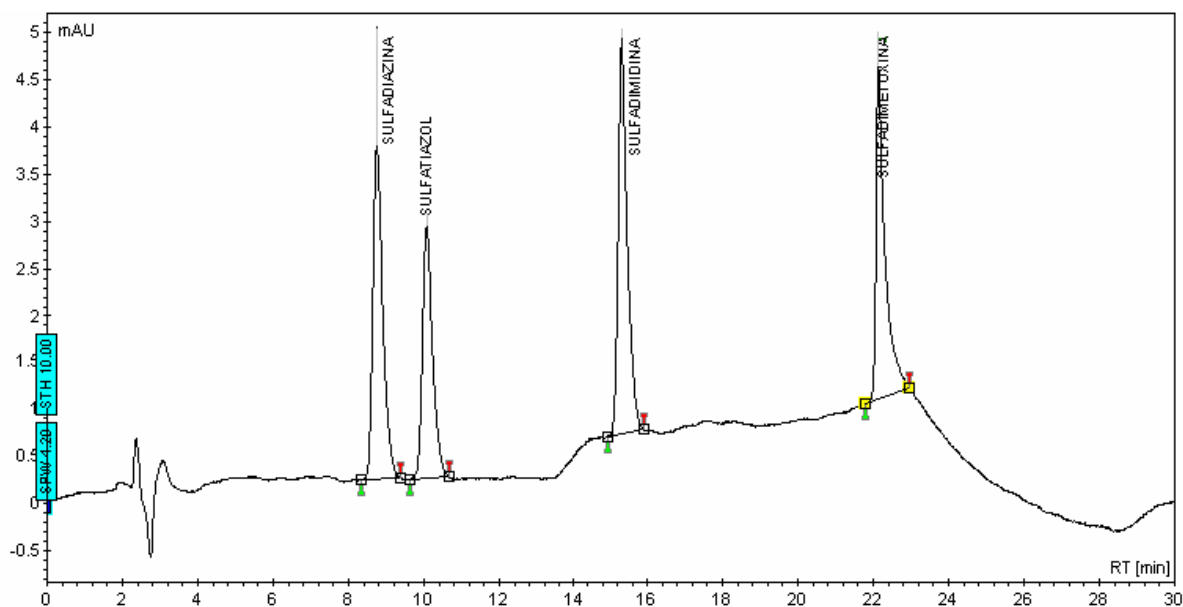


Figura 30 - Cromatograma de amostra testemunha fortificada no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹.

Os valores das recuperações das sulfonamidas obtidos nos três níveis ensaiados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das recuperações (n=5) com desvio padrão relativo e teste “t” calculado.

Sulfa	Nível (ng g ⁻¹)	RM (%)	t _{calc}
SDZ	25	77	-1,05
	50	86	-1,40
	100	88	-2,00
STZ	25	72	-1,64
	50	81	-1,05
	100	82	-2,25
SDD	25	79	-1,05
	50	84	-1,14
	100	86	-2,33
SDM	25	74	-1,62
	50	82	-1,80
	100	84	-2,67

RM (%)= média das recuperações; t_{calc}= teste “t” de *Student* calculado

6.6.6.3 Avaliação estatística do método

Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student de significância. Na Tabela 16 são apresentados os resultados com as médias das recuperações percentuais relativas (RM%) obtidas para 5 (n-1) repetições e o t calculado para 95% do intervalo de confiança ($t_{95\%}$) do método aplicado.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados menores que o valor tabelado, $t_{tab}=2,78$, (Quadro 02 – ANEXO 2). Deste modo, aparentemente não existem diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), podendo-se considerar o método exato.

6.7 ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

O método proposto após ser desenvolvido e validado, foi utilizado para estimar a concentração das quatro sulfonamidas de interesse nesta pesquisa em amostras comerciais de mel provenientes do Estado do Maranhão e de estados vizinhos como o Piauí e Tocantins. Todas as amostras foram coletas no período de setembro de 2007 a março de 2008. Na Tabela 17 são apresentados o número de amostras, as cidades de coleta e suas respectivas codificações.

O objetivo destas análises foi aplicar o método desenvolvido, não realizando, portanto, um controle de qualidade mais completo nas amostras utilizadas, para o qual seriam necessárias mais amostras e aplicação de procedimentos de amostragem e coleta específicos para tal fim.

Tabela 17 – Identificação das amostras utilizadas na aplicação do método.

Estado	Cidade	Nº de amostras	Código
Maranhão	São Luís	01	MA1
	Santa Luzia do Paruá	01	MA2
Piauí	Teresina	01	PI
Tocantins	Paraíso	01	TO1
	Barrolândia	01	TO2

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da aplicação do método nas amostras de comerciais de mel.

Tabela 18 – Análise das amostras comerciais de mel quanto à presença de sulfonamidas.

Composto	Quantidade média (ng g ⁻¹) em amostras de mel, n=3				
	MA1	MA2	PI	TO1	TO2
SDZ	nd*	nd	nd	nd	nd
STZ	nd	nd	nd	nd	nd
SDD	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado, aplicando o LD de 20 ng g⁻¹ e LMR de 100 ng g⁻¹.

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os cromatogramas das amostras de méis de Santa Luzia do Paruá, São Luís, Tocantins e Piauí analisadas utilizando-se o método proposto.

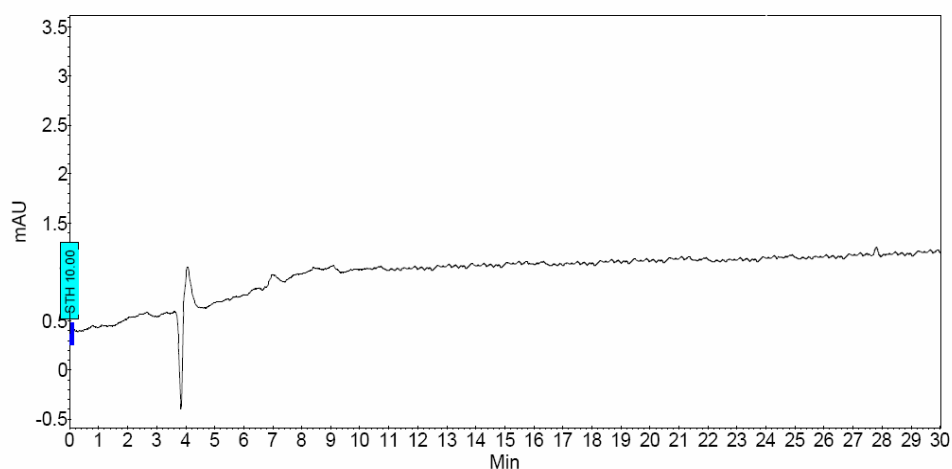


Figura 31 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de Santa Luzia do Paruá.

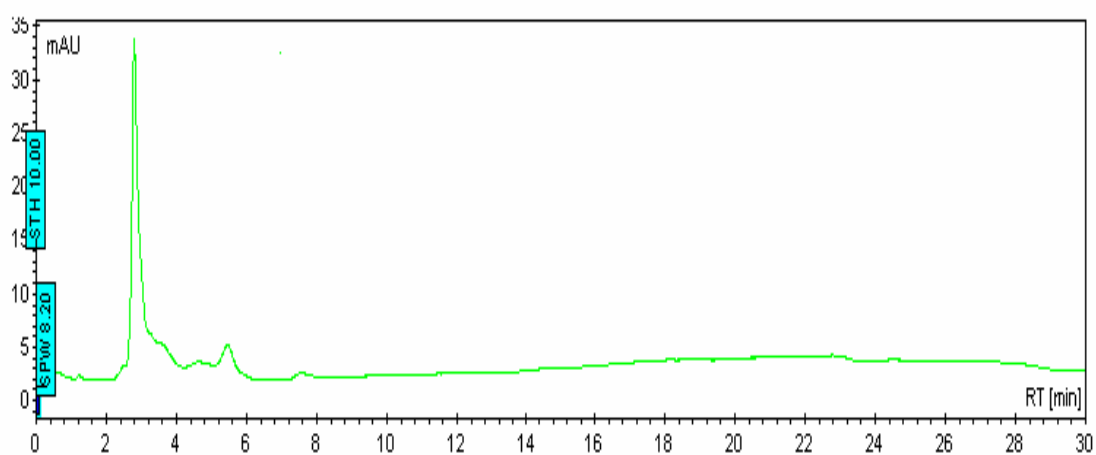


Figura 32 -Cromatograma da amostra de mel da cidade de São Luís.

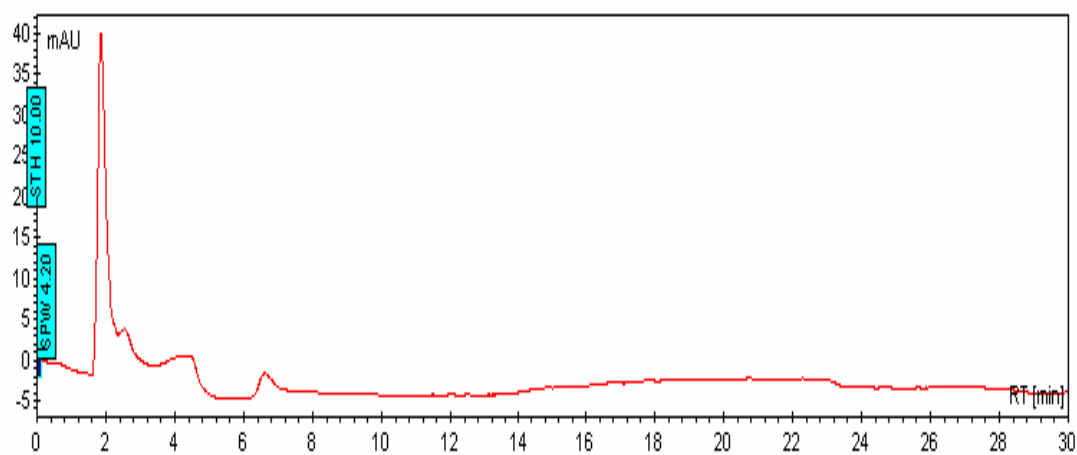


Figura 33 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Tocantins

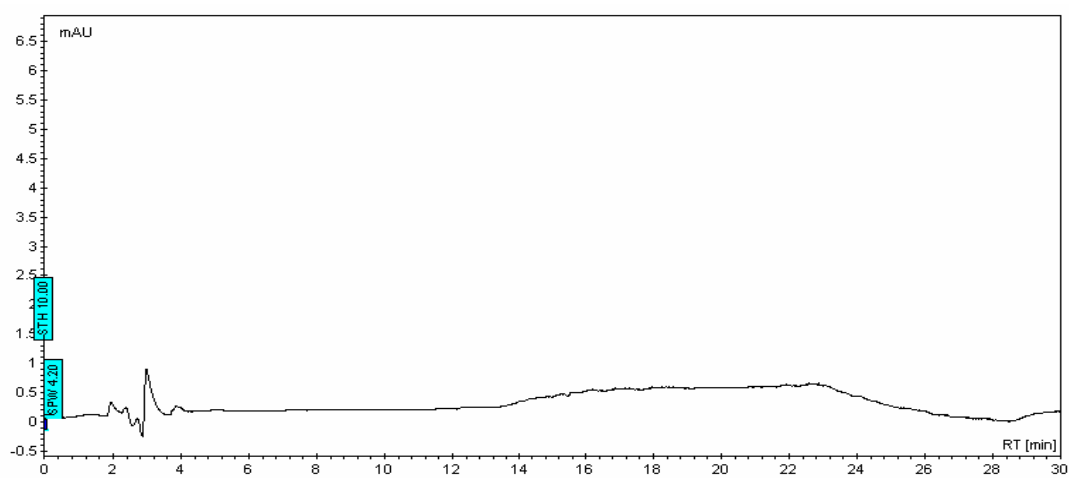


Figura 34 -Cromatograma da amostra de mel do Estado do Piauí

Verifica-se pelas Figuras 31, 32, 33 e 34 que não há presença de picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas, indicando que as amostras estão livres de contaminação por resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina. Também não foram verificados picos cromatográficos nos tempos de retenção das sulfonamidas nas outras amostras comerciais de mel estudadas.

7. CONCLUSÕES



7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel. O procedimento proposto foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato nas condições estabelecidas. Considerando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sulfonamidas ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), os limites de detecção e quantificação do CLAE-DAD apresentaram-se adequados para a análise de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina em mel.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de sulfonamidas em mel foi o preparo da amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realizou a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes.

A parte do trabalho relacionada aos estudos de pré-tratamento da amostra, ou seja, a etapa de hidrólise ácida mostrou-se eficiente para a redução do número de interferentes.

Os estudos de recuperação mostraram que para a extração de sulfonamidas em mel os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos Nexus. Foram realizados testes de recuperações em três níveis de concentração (25, 50 e 100 ng g^{-1}). As recuperações médias obtidas após otimização do método variaram de 72 a 88%, e os coeficientes de variação variaram de 2,84 a 12,99%.

Foi verificado que as amostras de mel coletadas e analisadas não apresentaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfadimidina e sulfadimetoxina, fato este que serve como indício da qualidade do mel produzido na Região Norte e Nordeste.

8. REFERÊNCIAS



8. REFERÊNCIAS

- [1] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000.
- [3] SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia – Relatório Completo**. Série Mercado. 2006.
- [4] PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. **Mel: Câmbio e Embargo Europeu podem prejudicar exportações em 2006**. Análises e Indicadores do Agronegócio. V.1, n.4. abril/2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>> Acesso em: 19 de março de 2007.
- [5] SHIMANUKI, H. Bacteria. In: Flottum, K. (Ed.), **Honey Bee Pests, Predators, and Disease**, third ed. pp. 33–54, Medina, Ohio. 1997.
- [6] SCHWARTZ, D.P.; SHERMA, J.. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.72, 1986.
- [7] SHERMA, J.; BRETSCHNEIDER, W.; DITTAMO, M.; DIBIASE, N.; HUH, D.; SCWARTZ, J.P. **Journal of Chromatography**. v.463, p.229, 1989.
- [8] NEIDERT, E; BARANIAK, Z.; SAUVE, A. **Journal Association Officcial. Analalytical Chemistry**. v.69, p.641, 1986.
- [9] SUN, H.; AI, L.; WANG, F. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. **Chromatographia**, v.66, N. 5/6, p.333-337, setembro, 2007.
- [10] FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M. de S.; SANTOS, J.G.R. dos; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTANA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.80-82, 2007.

- [11] ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p.307-311, 2006.
- [12] GALLINA, A.; BENETTI, C.; BIANCOTTO, G.; BAGGIO, A.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; MUTINELLI, F. Antibiotics residues in honey: validation procedure. **APIACTA**, V.40, P.45-49, 2005.
- [13] ZAYAS-BLANCO, F. de; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatography separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, p.375-378, 2004.
- [14] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.
- [15] AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 3531-3539, 1990.
- [16] SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, p. 875-879, 1990.
- [17] GARCÍA, J.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; ALDAMA, J.M. Validation of an analytical method to determine sulfamides in kidney by HPLC-DAD and PARAFAC 2 with first-order derivate chromatograms. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p. 222-234, 2007.
- [18] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European UNION REGULATION 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.23-29, 2004.
- [19] KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxyl/ N^4 -acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues and eggs. **Talanta**, v.67, p.54-58, 2005.

- [20] QUINTANA-RIZZO, J.; SALTER, R.S.; SAUL, S.J. Solid phase extraction procedures for validation of CHARM II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection of tylosin honey. **APIACTA**, V.40, P.55-62, 2005.
- [21] FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. **Chromatographia**, v.57, N. 5/6, p.317-320, 2003.
- [22] HAMMEL, Y.A; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.H.; GUY, P.A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p.58-76, 2008.
- [23] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.
- [24] MOHAMED, R.; HAMMEL, Y.-A.; LeBRETON, M.-H; TABET, J.-C.; JULLIEN, L.; GUY, P.A. Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1160, p.194-205, 2007.
- [25] LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v.72, p.1082-1087, 2007.
- [26] KISHIDA, K. Quantitation and confirmatory of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. **Food Control**, v.18, p.301-305, 2007.
- [27] BATT, A.L.; SNOW, D.D.; AGA, D.S. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. **Chemosphere**, v.64, p.1963-1971, 2006.

- [28] PERRET, D.; GENTILI, A.; MARCHESE, S.; GRECO, A.; CURINI, R. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance. **Chromatographia**, v. 63, p.225-232, 2006.
- [29] KERR, W. E. **Papel das abelhas sociais na Amazônia**. Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente. (Florianópolis – SC - Brasil). 119-129. 1979.
- [30] SEBRAE, Apicultura brasileira – Produção Nacional. Disponível em : <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/IBGE.pdf> Acesso: 07 fev. 2008.
- [31] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2003 – 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1> Acesso em 23 ago, 2007.
- [32] SODRÉ, G. da S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA - APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [33] CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985, 226p.
- [34] NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <<http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf>> . Acesso em: 05 ago 2007.
- [35] NATIONAL HONEY BOARD. **Story of honey**. Disponível em: <<http://www.honey.com/downloads/storyhoney.pdf>> . Acesso em: 05 ago 2007.
- [36] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.
- [37] CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2003. 42 p. (Série Meliponicultura - 01).
- [38] HOOPER, T. Guia do apicultor. [S.1]: Publicações Europ-América, p. 223-266, 1976.

- [39] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [40] SHIMANUKI, H., KNOX, D.A. Susceptibility of *Bacillus* larvae to Terramycin. **American Bee Journal**. 134, 125–126. 1994.
- [41] HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., KERSTERS, K., DEVOS, P., LOGAN, N. A., ALI, N., AND BERKELEY, R. C. W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ahs *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.46, 270–279. 1996.
- [42] ALIPPI, A. M., ALBO, G. N., LENIZ, D., RIVERA, I., ZANELLI, M., AND ROCA, A. E. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control of American foulbrood in honey bees. **J. Apic. Res.** v.38, 149–158. 1999.
- [43] SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**. v.313, 1072–1077. 2006.
- [44] NESTLÉ. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS, Disponível em: www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?download=M3wBPgDB/8ull6Du36WenojQ1NTTjaXZnqWfVpzLhmf> Acesso em: 05 jul. 2007.
- [45] PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- [46] GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8ª edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.

- [47] FELI, M.A.F. Antibacterianos – Sulfonamidas. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/sulfonamidas2007.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- [48] MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p.803-808, 2003.
- [49] WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 23, n. 4, p.362-384, abril, 2006.
- [50] MERCK, The Merck Index—**An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, Merck, Rahway, NJ, 1989.
- [51] WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.40, ISSUE 7, p. 723-730, abril, 2000.
- [52] MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Campinas-SP, 2007. 197p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. III - Universidade Estadual de Campinas.
- [53] QIANG, Z.; ADAMS, C. Potenciometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Research**. v.38, ISSUE 7, p.723-730, abril, 2000.
- [54] COMBS, M.T.; KHORASSANI, M.A.; TAYLOR, L.T. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy of eight sulfonamides. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 25, p.301-308, 1999.
- [55] O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? **Journal of Food Safety**, v. 18, p. 297-319, 1998.

[56] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[57] BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999. Disponível em: <

www.dgv.min-agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório%202006%20divulgação.pdf

> Acesso em: 22 de março de 2007.

[58] ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29/05/2003.

[59] DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. **In: Antimicrobials in foods**. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.

[60] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLMÍ, C.; CURINI, R. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.4614-4624, 2004.

[61] MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid-chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p.85-92, 2004.

[62] MARTEL, A.-C.; ZEGGANE, S. HPLC determination of sulfathiazole in French honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, N. 6, p.953-961, 2003.

[63] 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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p.534-541, 2003.

[64] HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, N. 5, p.786-789, 1992.

- [65] WANG, Z.; ZHANG, S.; DING, S.; EREMIN, S.A.; SHEN, J. Simultaneous determination of sulphamethazine and sulphadiazine in a new monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay. **Food Additives e Contaminants**. v.25, p.574-582, maio, 2008.
- [66] TAMOSUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. Comparison of LC and UPLC Coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. **Chromatographia**. v.67, p. 783-788, set, 2008.
- [67] GRANJA, R.H.M.M.; NINO, A M.M.; RABONE, F.; SALERMO, A.G. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. **Analytica Chimica Acta**. V. 613, p. 116-119, jan, 2008.
- [68] ZOU, Q.-H; WANG, J.; WANG, X.-F; LIU, Y.; HAN, J.; hou, f.; xie, m.-x. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal AOAC International**, v.91, p.252-257, jan, 2008.
- [69] BISWAS, A.K.; RAO, G.S.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MALIK, J.K. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8845-8850, 2007.
- [70] PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORINI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. **Analytical Chimica Acta**, v. 529, p. 15-20, 2005.
- [71] LAMBA, S.; SANGHI, S.K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.110-115, 2005.
- [72] PANG, G.-F.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; JIA, G.-Q; FAN, C.-L.; LI, X.-M.; LIU, Y.-M.; LI, Z.-Y.; SHI, Y.-Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.88, p.1304-1311, maio, 2005.

- [73] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p.259-264, 2005.
- [74] POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSA, J.; SNIEGOCKI, T.; GRZEBALSKA, A. Sulfonamides residues in honey. Control and Development of Analytical Procedure. **APIACTA**, v. 38, p.249-256, 2003.
- [75] REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**, V.38, P.23-30, 2003.
- [76] POSYNIAK, A.; SNIEGOCKI, T.; ZMUDZKI, J. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p.111-117, 2002.
- [77] HELLER, D.N.; NGOH, M.A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M.H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.39-52, 2002.
- [78] STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamides residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p.37-42, 2000.
- [79] ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 898, p.95-102, 2000.
- [80] FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimetoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p.185-191, 2000.

- [81] HEERING, W.; USLEBER, E.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAVER, E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v.123, p.2759-2762, 1998.
- [82] GEHRING, T.A; RUSHING, L.G.; CHURCHWELL, M.I.; DOERGE, D.R.; McERLANE, K.M.; THOMPSON JR, H.C. Determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 44, N. 10, 3164-3169, 1996.
- [83] 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, p.1457-1461, outubro, 1996.
- [84] VIÑAZ, P.; ERROZ, C.L.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescent derivatization. **Journal of Chromatography A**, v.726, 1995.
- [85] PATHY, M. Trace analysis of sulfaquinoxaline in animal tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Vol. 275, 115-125, 1983.
- [86] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation technique for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.36-53, 2007.
- [87] LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, p.1-35, 2004.
- [88] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p.68-76, 2001.
- [89] ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. São Carlos – SP. 83p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2006.

- [90] TEKEL, J.; HATRÍK, S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean up procedures and selective detectors. **Journal Chromatography A**, v.823, p.137-146, 1996.
- [91] QUEIROZ, S. C. N.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- [92] MAJORS, R. E. **LC-CG Supplement**. v.8, *maio*, 1998.
- [93] IMOTO, M. N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Curitiba – PR. p.134. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- [94] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. **Química Nova**, v.27, n.5, set./out., 2004.
- [95] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ – CGCRE – 008**, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> Acesso em: 24 maio 2007.
- [96] BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.
- [97] RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. Campinas-SP, 96p. Dissertação (mestrado) - Unicamp, 2004.
- [98] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.
- [99] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. London, 1995. Q2A

(CPMP/ICH/381/95). Disponível em: www.eudra.org/emea.html. Acesso em 11 de fev. 2008.

[100] THOMPSON, M.; ELISSON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure App. Chem.**, v.74, p.835-855, 2002.

[101] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals**. Expert Consultation, 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 11 fev. 2008.

[102] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

[103] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

[104] LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76p.

[105] HUBERT, P. et al The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

[106] USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776- 1777, 1995.

[107] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em 26 de out. 2007.

[108] BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.

[109] EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods**. Brussels: EUROPEAN COMMISSION, 2004. SANCO/825/00. rev.7. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf>.

Acesso em: 11 fev. 2008.

[110] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora, 2001.

[111] IBGE, Cidades - Prefeituras e Municípios 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>> Acesso em: 23 maio 2008.

[112] GOOGLE EARTH. Disponível em: <www.google.com>. Acesso em: 23 maio 2008.

[113] SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

[114] SHETH, H.B.; YAYLAYAN, V.A.; LOW, N.H.; STILES, M.E.; SPORNS, P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1125-1130, 1990.

[115] SCHWAIGER, I.; SCHUCH, R. **Dtsch. Lebensm.-Rundsch.** v. 96, p.93, 2000.

[116] CANCHO-GRANDE, B.; FALCÓN, M.S.G.; COMESAÑA, M.R.; GÁNDARA, J.S. Determination of sulfametazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3145-3150, jun. 2001.

[117] INMETRO - INSTITUTO DE QUALIDADE E METROLOGIA. **Expressão da Incerteza de medição**, Rio de Janeiro, Apostila, 2002.

[118] UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidande: validation of chromatographic methods**. Rockville: Center for Drug Evaluation

and Research (CDER), 1994. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf. Acesso em 11 de fev. 2008.

[119] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedural Manual**. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

[120] BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; SANTOS, T.C.R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p.155-168, 2002.

[121] CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Ver. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, jul./dez., 1994.

[122] DE AMARANTE Jr; O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R. dos; VALE, M.L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, São Luís, v.12, n.1/2, p.116-131, 2001.

[123] LEITE, F. In: **Validação em Análise Química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 4ª ed., 2002.

[124] CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgar Blücher, 1998, p.10.

[125] COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed. Unicamp. Campinas, 170 p., 1998.

[126] MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; DIEZ, M.M.; GARCÍA, M.C.M.; GIL, D.B.; CAÑADA-CAÑADA, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in Money simples. **Talanta**, v.73, p.304-313, 2007.

[127] THOMPSON, T.S.; PERNAL, S.F.; NOOT, D.K.; MELATHOPOULOS, A.P.; VAN DEN HEEVER, J.P. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.304-311, 2007.

- [128] LI, H.; KIJAK, P.J.; TURNIPSEED, S.B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: a multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.836, p.22-38, 2006.
- [129] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p.174-181, 2005.
- [130] THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p.168-176, 2005.
- [131] STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A Multiresidue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. **Analytica Chimica Acta**, v.547, p.262-268, 2005.
- [132] SOTO-CHINCHILA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCIA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)]oxalate as chemiluminescent reagent. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p.60-67, 2005.
- [133] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y.-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8468-8473, setembro, 2005.
- [134] MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, v.64, p.87-100, 2004.

- [135] CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDERIS, B.M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta**, v.494, p.21-28, 2003.
- [136] FUH, M.R.; CHU, S.Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p.215-221, 2003.
- [137] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separations conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v. 98, p.153-158, 2003.
- [138] CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and eggs. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, N. 3, p.558-566, 2003.
- [139] REVERTÉ, S.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.225-232, 2003.
- [140] KIM, D.-H.; LEE, D.W. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.153-158, 2003.
- [141] RHIJI, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A.; BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.121-133, 2002.
- [142] VERZEGNASSI, L.; SAVOY-PERROUD, M.-C.; STANDLE, R.H. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.77-87, 2002.

- [143] FUH, M.-R.S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, p.1127-1139, 2001.
- [144] LINDSEY, M.E.; MEYER, M.; THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.73, N. 19, p.4640-4646, outubro, 2001.
- [145] NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C.; BERNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfaquinoxaline, sulfamethazine and pyrimethamine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p.169-177, 2000.
- [146] DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p.1243-1247, 2000.
- [147] HANSEN, H.; BRODSGAARD, C.J. American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.80, p.5-23, 1999.
- [148] REEVES, V.B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.723, p.127-137, 1999.
- [149] KENNEDY, D.G.; McCRAKEN, R.J.; CANNAVAN, A.; HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p.77-98, 1998.
- [150] CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M.E.; DIMARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **Journal of Chromatography B**, v. 706, p.269-277, 1998.

- [151] AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.1-40, 1995.
- [152] KRISTLANSEN, G.K.; BROCK, R. Comparison of flow injection/thermospray MS/MS and LC/thermospray MS/MS methods for determination of sulfonamides in meat and blood. **Analytical Chemistry**, v.66, N. 19, p.3253-3258, outubro, 1994.
- [153] NIESSEN, W.M.A.; USLEBER, E.; SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. **Analyst**, v.119, p.2543-2548, dezembro, 1994.
- [154] PORTER, S. Confirmation of sulfonamides residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analyst**, v.119, p.2753-2756, 1994.
- [155] SHETH, H.B.; SPORNS, P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.1696-1700, 1991.
- [156] UMAGAT, H.; McGARRY, P.F.; TSCHERNE, R.J. Stability indicating sulfa drug analysis using high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, N. 7, p.922-924, 1979.

9. ANEXOS



9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Quadro 01 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel – PNCR/2007.

Grupo	Analito	Matriz	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR/NA* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	Mel	CLAE/UV	25	200	7
	Oxitetraciclina (a)					
	Tetraciclina (a)					
	Sulfatiazol (b)	Mel	CLAE/UV	25	100	15
	Sulfadimetoxina (b)					
	Sulfadiazina					
	Sulfaquinoxalina					
	Sulclorpiridazina	Mel	CL/EM-EM	0,5	1(I)*	30
	Nitrofurazona – SEM					
	Furazolidona – AOZ					
	Furaltadona – AMOZ					
	Nitrofurantoina - AHD					
	Tilosina	Mel	CL/EM-EM	0,5	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	Mel	CG/EM-EM	10	10	15
	Alfa-endosulfan			10	10	
	4,4-DDE			10	10	
	4,4-DDD			10	10	
	4,4 DDT			10	10	
	Dodecacloro			10	10	
	Endrin			10	10	
	Iprodiona			50	50	
	Tetradifona			20	20	
	Captana			50	50	
	Lindane			10	10	

Fonte: BRASIL [57].

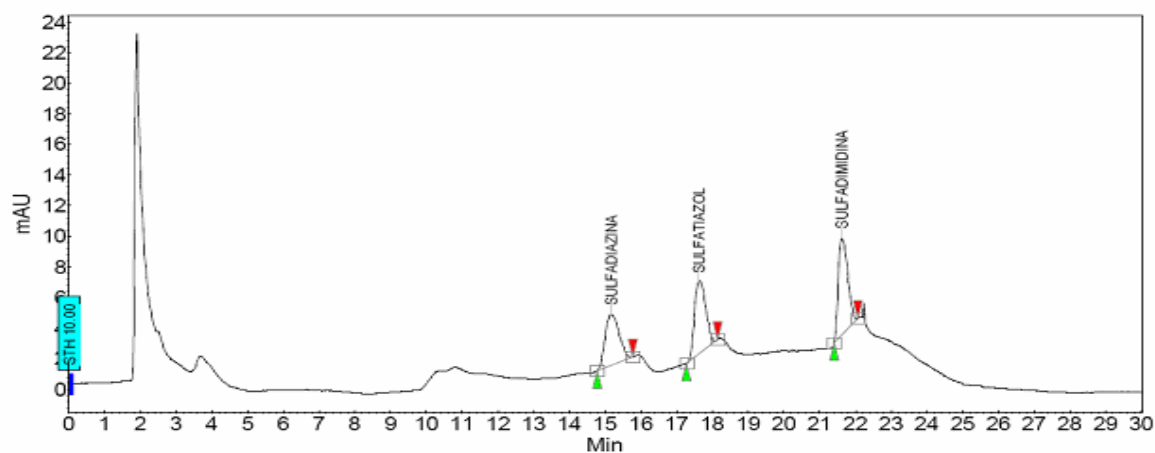
9.2 ANEXO 2

Quadro 02 – Distribuição dos valores do teste “*t*” de Student

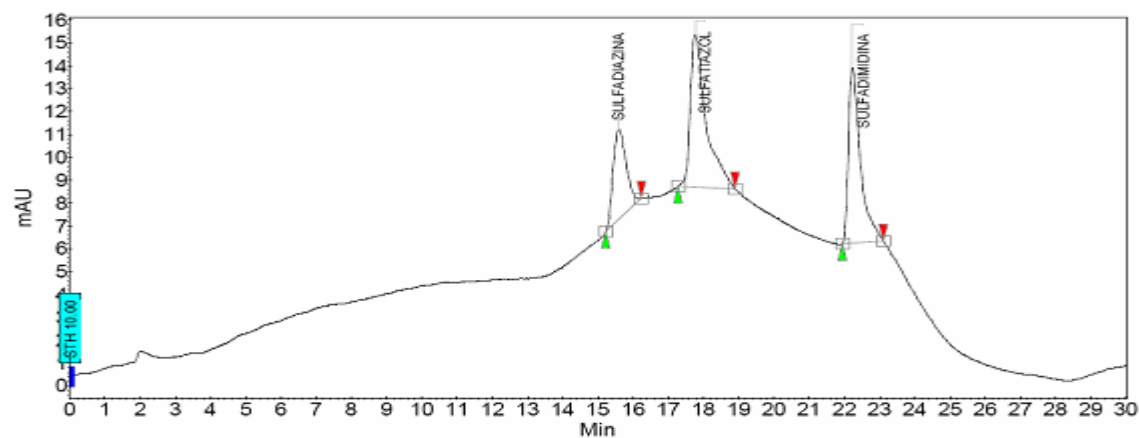
GL (n)	t _{95%}
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086

Fonte: Instituto de Qualidade e Metrologia [2002].

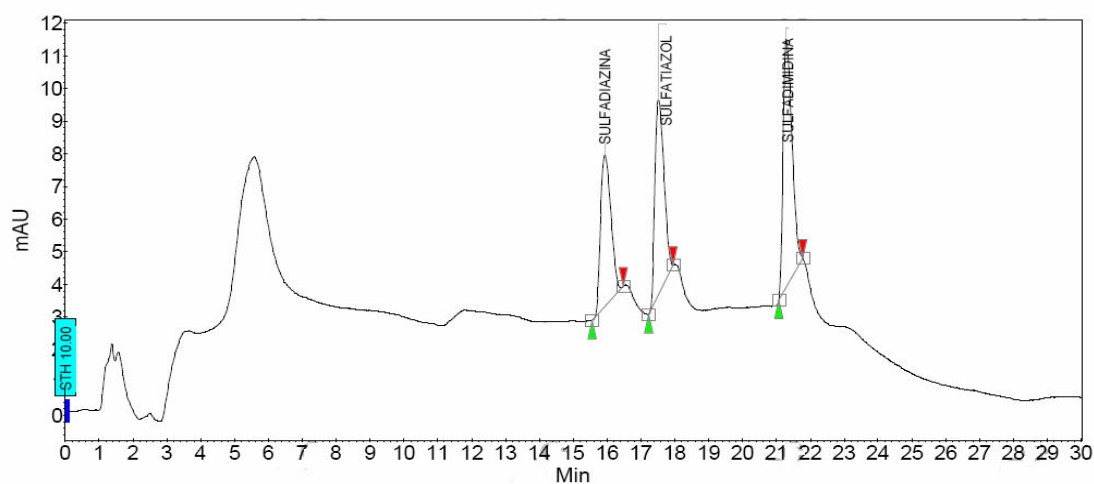
9.3 CROMATOGRAMAS DOS TESTES DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL



(a)

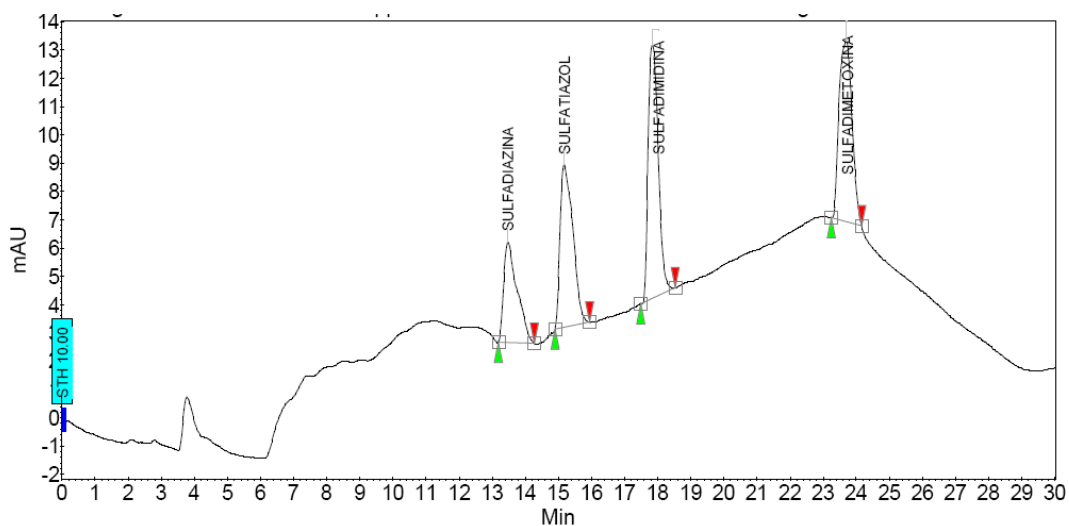


(b)

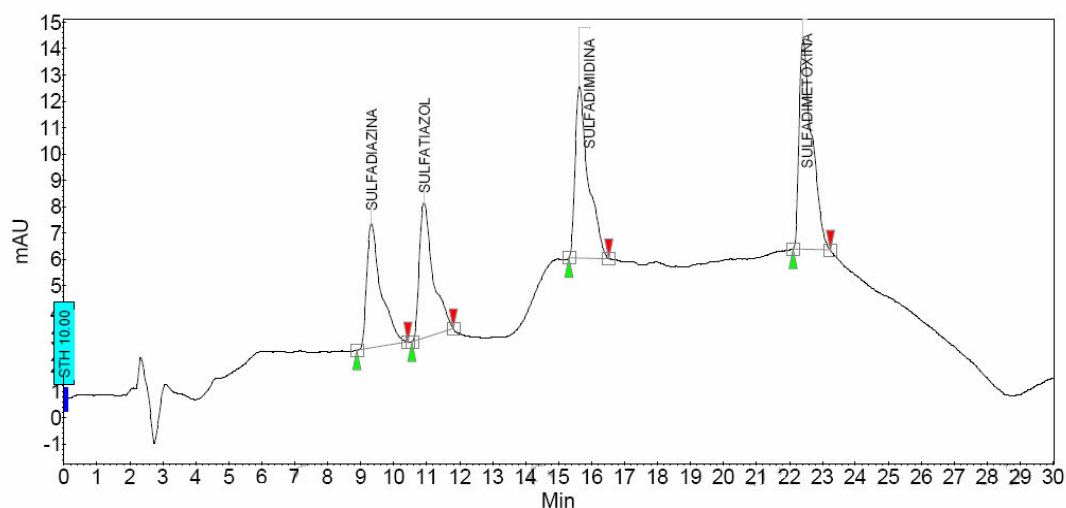


(c)

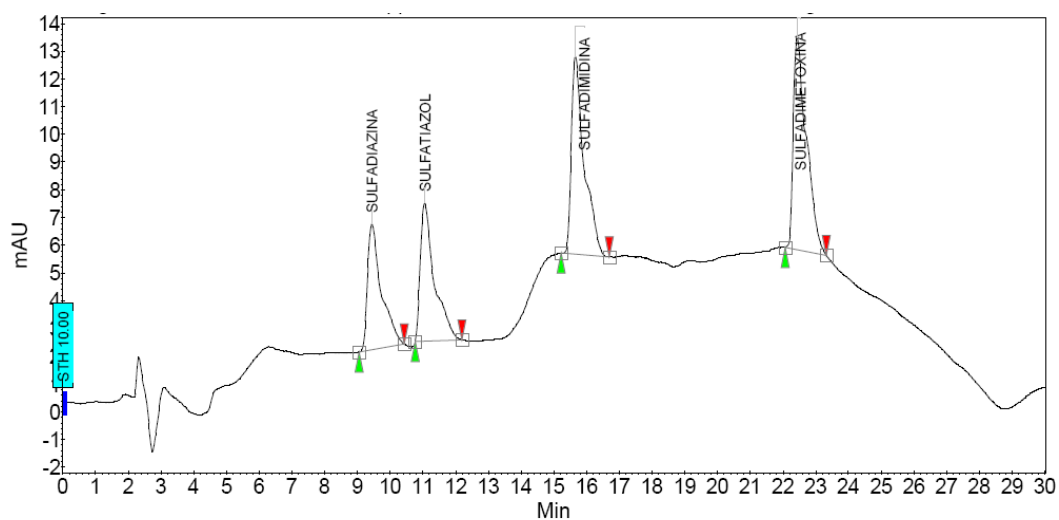
Figura 35 -Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fases móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/Metanol; (b) Solução de ácido acético 0,1%/Metanol e (c) Tampão acetato de sódio (0,05 mol L⁻¹) pH 4,5/Metanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 36 - Cromatogramas típicos obtidos nos testes com diferentes fase móveis na separação das sulfonamidas – (a) Fase: Água/ACN; (b) Solução de ácido acético 0,1%/ACN e (c) Tampão acetato de sódio pH 4,5/ACN.