Raquel Lourenço Mendonça

**Avaliação de Métodos Multirresíduos de preparo de amostra para
determinação de antimicrobianos em alimentos: QueChERS e MEPS**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. Lanças

São Carlos

2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Dedicatória

Este trabalho é dedicado em especial a Deus e aos meus pais Francisco e Lusinete Mendonça, pelo apoio e amor incondicional que me dedicam.

E para minhas irmãs, as quais souberam me entender e apoiar e pelo carinho.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Fernando Mauro Lanças pela orientação no trabalho;

A minha sobrinha Giovanna e meu primo João Antonio por todo cuidado e amor;

Aos colaboradores Camila Xavier, Leticia Dompieri, Meire Ribeiro, Prof. Dr Álvaro J. dos Santos-Neto, Alcimar Valerio;

A todos os amigos Elke Cliquet, Leticia Dompieri, Meire Ribeiro, Diana La Luna, Maraissa Franco, Maura Roquete, Natalia Sattolo, Lucas Sponton, Carlos Eduardo, Paulo Clairmont, Felipe Andrade, e outros que um dia dividiram comigo a bancada do Laboratório de Cromatografia (CROMA);

À Odete e a Elaine pela ajuda e paciência;

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pela infra-estrutura;

À dedicação de Andreia e Silvia (Pós-Graduação)

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP, MCT, MAPA e ao CNPq pelo apoio financeiro em projetos desenvolvidos no grupo.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, com este trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

(Charles Chaplin)

Resumo

As Sulfonamidas (SAs) são antibióticos de uso muito comum na medicina veterinária, sendo também aplicadas na medicina humana. Os resíduos dessas substâncias, ou dos seus metabolitos na carne e outros alimentos, podem causar efeitos adversos para a saúde dos consumidores como, por exemplo, resistências a antibióticos e alergias. Este trabalho apresenta o desenvolvimento e aplicação de métodos modernos de preparo de amostra para determinação de multirresíduo de sulfonamidas em alimentos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e ultravioleta visível. Dentre os métodos de preparo de amostra, aplicou-se o método de extração QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) modificado, em combinação com a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, para a análise de dez sulfonamidas em amostras de músculo de frango e bovino. No segundo estudo, seguindo a tendência de miniaturização, sintetizou-se um polímero molecularmente impresso (Sulfadimetoxina-MIP) para uso como sorbente em dispositivos de Microextração com Sorbentes Empacotado (MEPS). O método, denominado SDM-MIP-MEPS, foi otimizado e aplicado em amostras de músculo de frango usando a cromatografia líquida com detecção por ultravioleta-visível. Embora o uso do polímero molecularmente impresso (MIP) como sorbente seletivo para o MEPS já tenha sido reportada em dois trabalhos, pela primeira vez é descrito a aplicação de um MIP impresso com sulfadimetoxina (SDM), usando MEPS para extração de sulfonamidas em músculo de frango. Portanto, a novidade neste caso, é o uso da nova técnica extração miniaturizada (MEPS) com o polímero sintetizado sulfadimetoxina-MIP como sorbente de empacotamento. As metodologias foram validadas com sucesso de acordo com as diretrizes 657/2002/EU.

Abstract

Sulfonamides are widely used in veterinary and human medicine. Residues of these compounds, or their metabolites in animal meats and other foods, are toxic and can cause side effects in human's health, such as resistance to antibiotics and allergic reactions. This study describes the development and application of a modern sample preparation approach for sulfonamides multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry and ultraviolet-visible spectroscopy. Among those sample preparation methods, the modified QuEChERS extraction in combination with liquid chromatography in tandem with mass spectrometric detection was applied to the analysis of residues of 10 sulfonamides in chicken and cattle muscle. In the second study, following the miniaturization trends, it was synthesized a molecularly imprinted polymer (Sulfadimethoxine-MIP), for application as sorbent in Microextraction by Packed Sorbents (MEPS). The extraction method was optimized and successfully applied to chicken muscle samples in combination with high-performance liquid chromatography by ultraviolet-visible detection. Although the use of MIPs as selective packing materials for MEPS has already been reported in two papers, is first time that application of a MIP imprinted with Sulfadimethoxine is evaluated for the extraction of sulfonamides in chicken muscle. Therefore the novelty of the present work is the use of this new miniaturization extraction technique with synthesized sulfadimethoxine-MIP polymer as packing sorbent. The methods were successfully validated according to the 2002/657/EC guidelines.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Exportações mundiais de carnes de frango em 2011. -----	17
Figura 2 - Estrutura básica das Sulfonamidas. -----	25
Figura 3 - Estrutura das Sulfonamidas estudadas: 1- Sulfametazina (SMT), 2- Sulfametoxazol (SMX), 3- Sulfacetamida (SCD), 4- Sulfadimetoxina (SDM), 5- Sulfamerazina (SMR), 6- Sulfadiazina (SDZ), 7- Sulfaquinoxalina (SQX), 8- Sulfaclopiridazina (SCP), 9- Sulfametizol (SMZ), 10- Sulfatiazol (STZ).-----	26
Figura 4 - Sequência típica de Extração em Fase Sólida (SPE). -----	31
Figura 5 - Sequência do procedimento MSPD. -----	33
Figura 6 - Esquema do procedimento de Extração Líquida Pressurizada da Dionex ASE™ (PLE).-----	35
Figura 7 - Sequência típica de SPME. -----	36
Figura 8 - Interface do tipo <i>Electrospray</i> utilizada para o acoplamento LC-MS. Destaque para a formação dos íons no processo que são conduzidos para o contraprato pelo campo elétrico aplicado. -----	42
Figura 1.1 - Procedimento típico de extração QuEChERS-----	61
Figura 1.2 - Representação do desenvolvimento automatizado método MS/MS (XEVO TQ MS by Waters Corporation). -----	64
Figura 1.3 - Cromatograma do íon total obtido no modo MRM para uma amostra de músculo de frango fortificado com sulfonamidas no LMR (100 µg kg ⁻¹). -----	71
Figura 1.4 - Cromatogramas das transições estudadas obtidas no modo MRM para amostra de músculo de frango fortificada com 10 sulfonamidas no LMR (100 µg kg ⁻¹).-----	73
Figura 1.5 - Cromatogramas das transições estudadas obtidas no modo MRM para amostra de músculo bovino fortificada com 10 sulfonamidas no LMR (100 µg kg ⁻¹).-----	74
Figura 1.6 - Recuperações (%) de sulfonamidas em diferentes solventes (tecido bovino). ---	76
Figura 1.7 - Recuperações (%) de sulfonamidas em tecido bovino em diferentes condições de extração e clean-up.-----	77
Figura 1.8 - Cromatogramas para avaliação da especificidade para a matriz frango.-----	86
Figura 1.9 - Cromatogramas para avaliação da especificidade para a matriz bovina. -----	87
Figura 1.10 – Efeito de matriz sobre a matriz músculo de frango. -----	88
Figura 1.11 – Efeito de matriz sobre a matriz músculo de bovino. -----	88
Figura 2.1 - Esquema representativo do MEPS comercial. -----	101

Figura 2.2 - Protocolo MEPS de Preparo de Amostra de sangue e plasma usando como sorbentes C4, C8 ou C18.-----	102
Figura 2.3 - Síntese Convencional de Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs). -----	104
Figura 2.4 - Protocolo da Impressão Molecular não covalente e impressão covalente/semi-covalente.-----	105
Figura 2.5 - Estruturas moleculares de alguns reagentes de ligação cruzada empregados em síntese de MIPs. [25, 33]-----	109
Figura 2.6 - Estrutura química dos iniciadores radicalares mais empregados na síntese de MIPs. [25, 33] -----	110
Figura 2.7 - Gradiente de eluição cromatográfica -----	114
Figura 2.8 - Síntese da Sulfadimetoxina-MIP (SDM-MIP). -----	115
Figura 2.9 - Síntese do Polímero Molecularmente Impresso (SDM-MIP) e Não Impresso (NIP). -----	116
Figura 2.10 - Protocolo de Extração e <i>Clean up</i> usando SDM-MIP-MEPS. -----	118
Figura 2.11 - Espectro de absorção no infravermelho para SDM-MIP e NIP. -----	120
Figura 2.12 - Imagem de MEV da superfície do SDM-MIP e do NIP sintetizado. -----	121
Figura 2.13 - Recuperações em três níveis de fortificação para 7 sulfonamidas na matriz (200 μ L) -----	122
Figura 2.14 - Recuperações em três níveis de fortificação para 4 sulfonamidas na matriz (200 μ L) -----	122
Figura 2.15 - Recuperações em três níveis de fortificação para 4 sulfonamidas na matriz (100 μ L) -----	123
Figura 2.16 - Recuperações em três níveis de fortificação para 4 sulfonamidas em solvente (100 μ L) -----	124
Figura 2.17 – Cromatograma típico para SDM-MIP produzido.-----	125
Figura 2.18 – Cromatograma para o NIP produzido. -----	125
Figura 2.19 – Possível estrutura dos sítios de ligação para SDM no MIP sintetizado. -----	126
Figura 2.20 – Cromatograma para o branco da matriz (músculo de frango). -----	130
Figura 2.21 - Cromatograma para o extrato da matriz (músculo de frango) fortificado no LMR.-----	130

INDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculos de Recuperação	45
Equação 2 :Média Arimetimetica	45
Equação 3: Desvio Padrão	46
Equação 4: Coeficiente de Variação (CV)	46
Equação 5: Limite de Decisão ($CC\alpha$)	47
Equação 6: Capacidade de Decisão ($CC\beta$)	47
Equação 1.1:Cálculo do Efeito de Matriz.....	69
Equação 1.2: Cálculos de robutez.....	70

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Fases sorbentes mais utilizados em SPE para analitos orgânicos com massa molecular < 2.000 Daltons. -----	32
Tabela 1.1 - Metodologias de Extração estudadas.-----	66
Tabela 1.2 - Otimização das Metodologias de Extração -----	66
Tabela 1.3 - Fatores avaliados na robustez do método -----	68
Tabela 1.4 - Matriz de Youden. -----	68
Tabela 1.5 - Gradiente de eluição utilizado -----	71
Tabela 1.6 - Parâmetros de quantificação e confirmação no modo MRM (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>) - LC-MS/MS -----	72
Tabela 1.7 - Linearidade para detecção de 10 sulfonamidas em músculo de frango e bovino.	78
Tabela 1.8 - Recuperação -----	79
Tabela 1.9 - Repetibilidade -----	81
Tabela 1.10 - Reprodutibilidade -----	83
Tabela 1.11 - Robustez -----	85
Tabela 1.12 - Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).-----	89
Tabela 1.13 - Cromatograma para amostra real de músculo bovino compradas de supermercados locais. -----	90
Tabela 2.1 - Comparação entre sínteses de Polímeros Molecularmente Impressos por Impressão não-covalente e covalente.-----	106
Tabela 2.2 - Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP. -----	108
Tabela 2.3 - Fatores avaliados na robustez do método -----	119
Tabela 2.4 - Dados da linearidade para detecção das sulfonamidas em músculo de frango.-	126
Tabela 2.5 – Limites de detecção e Limites de Quantificação para as Sulfonamidas estudadas. -----	127
Tabela 2.6 - Estudo de Recuperação da metodologia. -----	127
Tabela 2.7 - Estudos de precisão-----	128
Tabela 2.8 - Robustez do Método -----	129
Tabela 2.9 - Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de detecção ($CC\beta$) -----	129

SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	15
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Agropecuária Brasileira.....	16
1.2 Resíduos e Contaminantes em Alimentos de Origem Animal	18
1.3 Órgãos Regulamentadores e o Limite Máximo de Resíduos	19
1.4 Uso de Antimicrobianos/Antibióticos na Produção Animal	24
1.5 Preparo de Amostras.....	28
1.5.1 Extração com Solvente (LLE)	29
1.5.2 Extração em Fase Sólida (SPE)	30
1.5.3 Extração por Dispersão da matriz em Fase Sólida (MSPD).....	33
1.5.4 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)	34
1.5.5 Microextração em Fase Sólida (SPME)	35
1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) - Análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.....	37
1.6.1 Espectrofotometria eletrônica na região do Ultravioleta-visível (LC-UV/Vis) ..	39
1.6.2 Espectrometria de Massas in tandem (LC-MS/MS) em análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.....	40
1.7 Validação do Método Analítico.....	43
1.7.1 Especificidade/Seletividade.....	44
1.7.2 Linearidade	44
1.7.3 Recuperação/Exatidão	44
1.7.4. Precisão.....	45
1.7.5 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$).....	46
1.7.5.1 Procedimento de Determinação do $CC\alpha$ e $CC\beta$	47
2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Capítulo 1: Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Sulfonamidas em Músculo Bovino e Frango empregando LC-MS/MS.....	58
1. INTRODUÇÃO.....	59
1.1 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)	60
1.1.2 Etapas do QuEChERS	60
2. OBJETIVO	62
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	63
3.1 Reagentes.....	63
3.2 Otimização do Método Cromatográfico e MRM (Multiple Reaction Monitoring)....	63
3.3 Otimização do Método de Preparo da Amostra.....	64
3.3.1 Extração para Análise por LC-MS/MS pós-otimização	66
3.4 Validação da Metodologia.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1 Otimização do método LC-MS/MS.....	71
4.2 Otimização do método de Extração.....	75
4.3 Resultados da Validação.....	77
4.3.1 Linearidade	77
4.3.2 Recuperação.....	78
4.3.3 Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade).....	80
4.3.4 Robustez	84
4.3.5 Seletividade/Especificidade.....	85
4.3.6 Estudo do Efeito de matriz	88
4.3.7 Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de detecção ($CC\beta$)	89
4.3.8 Análise de Amostra Real	90
5 CONCLUSÃO.....	91
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Capítulo 2: Síntese de Polímeros Molecularmente Impressos (SDM-MIP) e estudo de sua aplicação como sorbente em Microextração com Sorbente Empacotada (MEPS) para a determinação de sulfonamidas em músculo de frango	98
1. INTRODUÇÃO.....	99
1.1 Microextração com Sorbentes Empacotada (MEPS)	101
1.2 Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)	103
2. OBJETIVO	112
3. JUSTIFICATIVAS	112
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	113
4.1 Padrões e Reagentes	113
4.2 Instrumentação.....	113
4.3 Metodologia.....	113
4.3.1 Preparo dos Padrões Analíticos	113
4.3.2 Condições cromatográficas.....	114
4.3.3 Síntese do SDM-MIP e do NIP (Polímero Não Impresso).....	114
4.3.4 Caracterização do SDM-MIP e NIP (Polímero Não Impresso)	116
4.3.5 Preparo da Amostra	116
4.3.5.1 <i>Extração</i>	117
4.3.5.2 <i>Clean up empregando dispositivos MEPS</i>	117
4.3.6 Avaliação da seletividade do SDM-MIP e NIP.....	118
4.3.7 Validação da Metodologia.....	118
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
5.1 Caracterização e avaliação da seletividade do SDM-MIP e NIP	120
5.2 Otimização do preparo da amostra	121
5.3 Avaliação da seletividade do SDM-MIP e NIP	124
5.4 Validação da Metodologia.....	126
6. CONCLUSÃO.....	132
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
Capítulo 3: Conclusão Geral	98

PREFÁCIO

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos, nos quais são reportados o desenvolvimento e aplicação das técnicas de preparo de amostras QuEChERS e MEPS para análises de alimentos empregando LC-MS/MS e HPLC-UV/Vis.

O **Capítulo 1** descreve o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica de preparo de amostra baseado na abordagem QuEChERS para determinação de sulfonamidas em tecido animal. O método foi desenvolvido, otimizado e validado para análises de resíduos de sulfonamidas em tecido de frango e bovino. O mesmo apresentou-se simples, de baixo custo, rápido e ambientalmente amigável quando comparado a métodos convencionais de preparo de amostra.

O **Capítulo 2** apresenta o desenvolvimento de fases seletivas para uso como sorbente nos dispositivos MEPS. A MIP-MEPS apresenta várias vantagens em relação às técnicas de extração convencionais, tais como: redução do volume de solvente orgânico, instrumentação analítica simples, além da maior especificidade devido o uso do material seletivo. O polímero sulfadimetoxina-MIP foi sintetizado para análises específicas de sulfonamidas em alimentos.

Devido à seletividade do MIP e a eficiência do MEPS foi possível analisar resíduos de sulfonamidas em tecido animal atestando a aplicabilidade do método MIP-MEPS. Cabe aqui salientar que o cartucho (BIN) empregado para acondicionamento do polímero sintetizado no dispositivo MEPS é de fabricação caseira (“*home made*”).

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Agropecuária Brasileira

A extensão territorial e as condições climáticas e os programas voltados para a sanidade animal e segurança do alimento, são fatores que tem contribuído para que o agronegócio ocupe posição de extrema relevância no contexto econômico do nosso país. Tais fatores têm posicionado o Brasil como um dos maiores produtores de carne bovina e com potencial para atender as exigências específicas do mercado internacional.

De 1975 a 2009, a agropecuária brasileira apresentou um crescimento médio anual de 3,57%. Uma análise sobre o comportamento do setor agropecuário nos últimos 35 anos, feita pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) aponta o Brasil à frente de países com tradição na produção e exportação de alimentos, como é o caso dos Estados Unidos. Segundo o MAPA, até 2020 a expectativa é que a produção nacional de carnes bovina atenderá 44,5% do mercado mundial, a carne de frango terá 48,1% das exportações mundiais e a participação da carne suína será de 14,2% [1-3].

Especificamente no caso produção de carne bovina brasileira, essa tem apresentado um elevado potencial de crescimento, proporcionando ao Brasil a posição de 2º lugar na produção mundial no ano de 2011; atrás apenas dos Estados Unidos. [2] Quanto as exportações de carne bovina em 2011, o Brasil registrou 1,325 milhões de toneladas exportadas ficando atrás apenas da Austrália; maior exportador de carne bovina no ano 2011, com 1,350 milhão de toneladas exportadas. Este volume representa um aumento de 295,5% com relação ao volume exportado há 20 anos, que foi de 335 mil toneladas. As exportações brasileiras de carne bovina representaram 16,8%, e a da Austrália e 17,2% de 7,869 milhões de toneladas exportados em 2011. [4]

Há também excelentes resultados das exportações com relação às exportações de frango. A produção de carne de frango chegou a 13,058 milhões de toneladas em 2011, com um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção em 2011 teria somado 13,2 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos com 16,757 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA). [3]

Em 2011, do volume total de frangos produzido pelo país, 69,8% foi destinado ao consumo interno, e 30,2% para exportações. Mesmo assim, o Brasil se mantém líder no ranking dos países que mais exportam carnes de frango (Figura 1) [3]. Estes dados

demonstram que participação brasileira no comércio internacional tem crescido a cada ano, com destaque para a produção de carne de frango.

Considerando a importância da pecuária no contexto socioeconômico do Brasil e sua contribuição para o desenvolvimento do país, tem se exigido cada vez mais produtividade e qualidade para a ampliação da exportação do produto. Assim, com o intuito de assegurar a produtividade e a competitividade do setor, a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia tornou-se uma prática bastante comum na agropecuária brasileira.

Hoje o controle da sanidade animal e a segurança alimentar são imprescindíveis para que o país atenda às exigências do mercado internacional. Deste modo, a fim de garantir a inocuidade desses alimentos ofertados ao consumo humano, vários métodos analíticos desenvolvidos e validados são empregados, os quais permitem identificar resíduos decorrentes do emprego de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais.

Figura 1 - Exportações mundiais de carnes de frango em 2011.

Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORAS DE FRANGO (UBABEF). **Relatório Anual Ubabef 2012**. 2012. Disponível em: < <http://www.abef.com.br> >. Acesso em: 22 out. 2012.

1.2 Resíduos e Contaminantes em Alimentos de Origem Animal

Resíduos químicos e contaminantes em alimentos são vestígios de substâncias que podem ser encontrados nos alimentos de origem animal (carne, leite e ovos, etc.) ou vegetal (verduras, frutas, grãos, etc.) após algum tipo de administração. Estes podem ser, por exemplo: antibióticos, pesticidas, vermífugos, etc. Normalmente essas substâncias são eliminadas pela lixiviação, volatilização, degradação ou ainda fezes e urina dos animais. Se observado o tempo de carência para abate do animal, coleta ou colheita, a probabilidade destes serem encontrados em alimentos acima dos níveis de tolerâncias é baixa. Mesmo assim, níveis de concentração na faixa de ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$), ou mesmo inferior (ppt; ng kg^{-1}) poderão ser detectados. [1, 5, 6]

As análises de resíduos químicos em alimentos de origem animal é uma prática recente. O primeiro estudo documentado sobre cooperação entre laboratórios para análises de resíduos datam de 1978, sendo este documentado pela BENELUX – organização econômica da Europa formada pelos países, Bélgica, Países Baixos e Luxemburgo, que originou a atual União Européia (EU). Embora haja registros sobre análise de resíduos pela BENELUX da década 60 e 70, pesquisas envolvendo o controle de resíduos em animais destinado ao abate pelos demais países europeus são mais recentes. Entretanto, desde 1950, um grande número de medicamentos veterinários vem sendo utilizado em grande escala na prática agropecuária, sendo administrados como aditivos em rações, injetáveis ou através da água a fim de garantir a saúde animal. Além disso, medicamentos veterinários são aplicados em doses subterapêuticas para estimular crescimento e engorda. [5, 7, 8]

Os resíduos de medicamentos veterinários e/ou contaminantes em alimentos de origem animal podem ocorrer a partir da não observância do tempo de carência para abate ou coleta, de rações e/ou águas contaminadas, aplicação de pesticidas em áreas de produção animal (tratamento de estábulos, currais, etc.), assim como de aplicações abusivas. Isto poderá conduzir a uma série de problemas de segurança alimentar.

Uma série de fenômenos envolvendo contaminações e presença de resíduos em alimentos tem sido frequentemente relatada. A presença destas substâncias nos alimentos pode causar efeitos adversos à saúde humana. Os efeitos tóxicos nos seres humanos incluem, por exemplo, efeito teratogênico que podem levar a má formação do feto provocado pela exposição da gestante a medicamentos como nitrofuranos e tetracíclicas; reações alérgicas provocadas por sulfonamidas; resistência bacteriana no caso de exposição prolongada a antibióticos, e outros. [9,12]

Em 2011, casos de contaminação com uma bactéria (*Escherichia coli* enterohemorrágica - EHEC) proveniente de brotos de vegetais provocou a contaminação e morte de várias pessoas na Alemanha, espalhando-se para outros países como Holanda, Suécia e Reino Unido. Os sintomas incluíam dores abdominais, náuseas e vômitos, e febre que derivavam em disfunções renais e neurológicas. Ainda em 2011, um surto da bactéria *listeriosis* nos Estados Unidos, presente em melões contaminados, causou 28 mortes e deixou outras 133 pessoas doentes. [13, 14]

Outro caso de grande relevância, ocorrido em 2010, foi o da bactéria *Escherichia coli*. Essa bactéria mostrou-se resistente até ao carbapenem, um grupo de antibióticos utilizado como última tentativa em tratamentos de emergência contra bactérias resistentes a muitos remédios. A “superbactéria”, como ficou conhecida, apresentou mutações durante o tratamento de pacientes que haviam sido submetidos a cirurgias estéticas. Inicialmente o caso foi registrado na Índia e Paquistão, porém esta bactéria chegou ao Reino Unido através de ingleses que foram à Índia para se submeterem a cirurgias estéticas e tratamentos médicos. Casos mais antigos, porém não menos importantes de serem relatados, foram: "doença da vaca louca", contaminação de frangos por dioxina, e escândalo do cloranfenicol. [15, 16, 17, 18]

Atualmente, órgãos sanitários governamentais nacionais e internacionais têm dedicado especial atenção ao controle de resíduos de medicamentos, devido à possibilidade de risco para a saúde humana representados pela exposição direta aos resíduos químicos e contaminantes em alimentos, tais como a toxicidade e, principalmente, o desenvolvimento de resistência bacteriana. Diante do exposto acima, cada vez mais os consumidores tem buscado adquirir alimentos com certificados de qualidades, principalmente àqueles que apresentam selos de produto orgânicos.

1.3 Órgãos Regulamentadores e o Limite Máximo de Resíduos

O grande consumo de alimentos provenientes de fontes animais, como exemplo, o consumo de leite, ovos e carnes, tem tornado os programas de controle de qualidade muito mais criteriosos. Programas como do órgão regulamentador europeu EMEA (do inglês, *European Medicines Agency*), por exemplo, exigem por lei que os gêneros alimentícios (carne, leite, ovos, etc.) provenientes de animais tratados com medicamentos veterinários ou expostos a produtos biocidas utilizados na criação de animais, não contenham qualquer resíduo que possa representar perigo à saúde do consumidor. [1,19]

Considerando que a administração de medicamentos veterinários em animais destinados para produção de alimentos pode conduzir à presença de resíduos em alimentos, e a fim de proteger a saúde pública, Limites Máximos de Resíduos (LMRs) vem sendo estabelecidos em conformidade com princípios reconhecidos de controle de segurança alimentar. Os Limites Máximos dos Resíduos em alimentos são determinados pelo *Codex Alimentarius* (do latim Código Alimentar) estabelecido pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ou pelo Ministério da Agricultura ou Saúde de cada país. As ações desses órgãos têm como objetivo reduzir a probabilidade de introdução de um perigo que possa afetar a segurança alimentar visando à proteção do consumidor. [1, 19, 20]

A União Européia define resíduos de medicamentos veterinários e Limite Máximo de Resíduos (LMR) respectivamente como:

Resíduos de medicamentos: são todas as substâncias farmacologicamente ativas, sejam elas princípios ativos, excipientes ou produtos de decomposição, e respectivos metabolitos, que permanecem nos gêneros alimentícios provenientes de animais a que tenham sido administrados os medicamentos veterinários. [20]

Limite máximo de resíduos (LMR): é a concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou µg/kg de peso fresco) que a comunidade pode aceitar como legalmente autorizada ou que é reconhecida como aceitável à superfície ou no interior de um alimento. [20]

Sendo assim, Limite Máximo de Resíduo (LMR) pode ser resumidamente definido como a concentração máxima de resíduos de uma determinada substância que é admissível em um produto alimentar. [21,22]

Este limite baseia-se no tipo e quantidade de resíduos que se considera não apresentarem qualquer risco de toxicidade para a saúde humana nos termos expressos pela dose diária aceitável (DDA) ou com base numa DDA temporária com um fator de segurança adicional. Atende também a outros riscos pertinentes para a saúde pública. [20]

Na União Européia (EU), a utilização de medicamentos veterinários é regulamentada através do Regulamento 2377/90/EC. Este regulamento descreve o procedimento para o estabelecimento de limites máximos de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. Seus anexos apresentam as seguintes informações:

Anexo I – inclui as substâncias para as quais foram estabelecidos LMRs;

Anexo II – inclui as substâncias as quais não “representam” risco a saúde pública, não sendo considerado necessário o estabelecimento de LMRs;

Anexo III – inclui substâncias com LMR provisórios. Estes são estabelecidos por um período de tempo, quando nem todos os requisitos para o estabelecimento do LMR tenham sido definidos;

Anexo IV – inclui substâncias para as quais não é possível estabelecer o LMR, pois seus resíduos constituem um risco a saúde do consumidor em qualquer nível. A administração em animais produtores de alimento das substâncias presentes no Anexo IV é proibida. [8, 20]

A proibição da utilização de agentes de promoção de crescimento como, por exemplo, hormônios e β -agonistas está prevista na Diretiva 96/22/CE. Na diretiva 96/23/EC as substâncias são divididas em duas classes principais: substâncias do grupo A e B. [22]

Substâncias do grupo A, envolvem os promotores de crescimento e as substâncias "sem Limite Máximo de Resíduos (LMR)" e podem ser subdivididas em quatro grandes grupos: anabolizantes, tireostáticos, beta-agonistas e substâncias do Anexo IV.

Compostos do grupo B são aquelas que compreendem todos os medicamentos veterinários registrados e em conformidade com os Anexos I e III do regulamento 2377/90/EC e outros resíduos como resumido abaixo. [8]

Grupo A: Substâncias com efeitos anabolizantes e substâncias não autorizadas

- Estilbenos, derivados de estilbenos e seus sais e ésteres
- Agentes antitireoidianos
- Esteróides
- Lactonas ácidas resorcílicas, incluindo zeranol
- Beta-agonistas
- Compostos do Anexo IV do Regulamento do Conselho 2377/90/EC.

Grupo B: Medicamentos veterinários e contaminantes

- Substâncias antibacterianas, incluindo as sulfonamidas e quinolonas
- Outros medicamentos veterinários:
 - anti-helmínticos
 - Anticoccidiostáticos, incluindo nitroimidazóis
 - Carbamatos e piretróides
 - Sedativos
 - antiinflamatórios não esteroidais

- Outras substâncias farmacologicamente ativas
- Outras substâncias e contaminantes ambientais:
 - Organoclorados, incluindo PCBs
 - Oganofosforados
 - Elementos químicos (As, Pb, Cd, Hg, etc)
 - Micotoxinas
 - Corantes e outros

A Diretiva 96/23/CE inclui também o controle de animais produtores de alimentos, bem como seus produtos primários, como carne, leite, ovos e mel. Isto significa que as amostras são tomadas a partir do animal vivo em unidades de produção, bem como a partir de carcaças no matadouro [8]. O controle para os compostos do Grupo A é mais criterioso, ou seja, tem prioridade maior - um número relativamente grande de amostras tem de ser analisadas e critérios mais rigorosos têm de ser aplicados, tendo em vista as graves implicações dos resultados para a saúde pública. A Diretiva 96/23/CE estabelece também que as amostras coletadas para o Programa Nacional de Vigilância devem ser analisadas em laboratórios acreditados no INMETRO pela norma ISO 1725. [8, 22]

A Vigilância Sanitária de alimentos no Brasil datam do século XVI, mas somente em 1950, através da Lei nº 1.283, foi estabelecida a obrigatoriedade da prévia fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário de todos os produtos de origem animal, comestíveis e não comestíveis sejam ou não adicionados de produtos vegetais, preparados, transformados, manipulados, recebidos, acondicionados, depositados e em trânsito [23,24]. Em 1952 o Decreto nº 30.691/52, ainda vigente, aprovou o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RISPOA). [25]

Em 1953 foi delegado o Ministério da Saúde (MS) por meio do decreto 49.974/61, atribuições relativas à promoção, proteção e recuperação da saúde, incluindo entre outras, medidas de controle sanitário de alimentos. O artigo 65º, parágrafo 2º determinou a participação do órgão federal de saúde (MS) no registro e licenciamento de inseticidas destinados à agricultura, no tocante à avaliação dos riscos à saúde humana. [26]

Objetivando o controle de resíduos de substâncias de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais em produtos de origem animal, foi instituído pela Portaria nº 86/79, o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes (PNCRBC). A Portaria nº

86 foi mais recentemente adequada pela Portaria Ministerial nº. 51, de 06 de maio de 1986 e esta adequada pela Portaria Ministerial nº. 527, de 15 de agosto de 1995. [26-29]

O PNCRC é um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos, baseado em análise de risco, que visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários, de agrotóxicos ou afins, de contaminantes ambientais (ex: aflatoxinas) e de contaminantes inorgânicos (metais pesados), que fornece garantias de um sistema que provenha à segurança e a inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores e que seja equivalente aos requisitos sanitários internacionais estabelecidos pelo MERCOSUL, CODEX, OMC, e órgãos auxiliares (FAO, OIE, WHO). [30]

Diretrizes, programas, planos de trabalho e ações correspondentes constam no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), instituído pela Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999. As substâncias priorizadas no Programa de Controle de Resíduos em Carne – (PCRC) são: Penicilina, Estreptomicina, Tetraciclina, Eritromicina, Neomicina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina, Cloranfenicol, Sulfatiazol, Sulfametazina, Sulfadimetoxina, Sulfaquinoxalina, Nicarbazina, Nitrofurazona, Furazolidona, Tapazol, Tiouracil, Metiltiouracil, Propiltiouracil, Abamectina, Doramectina, Ivermectina. Além desses antimicrobianos, tireostáticos e antiparasitários, constam também contaminantes tais como: Aldrin, Alfa-BHC, Beta-BHC, Lindane, HCB, Dieldrin, Endrin, Heptaclor, Clordane, Mirex, DDT e Metabólitos, Metoxiclor, PCBs, e metais pesados. [24]

Para o ano de 2012, foi publicada a Instrução Normativa SDA N.º 11, de 22 de maio de 2012, que aprovou o escopo analítico para o monitoramento dos produtos de origem animal nesse ano, sendo que os resultados do monitoramento de 2011 foram divulgados por meio da Instrução Normativa SDA N.º 07, de 04 de abril de 2012. [30]

O estabelecimento dos Limites Máximos de Resíduos no Brasil é competência do Ministério da Saúde (MS). No caso de não estarem estabelecidos pelo MS, utilizam-se os valores internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA. [27]

O Brasil como grande produtor e fornecedor de algumas importantes “*commodities*” para os mais diferentes países, além de apresentar grande consumo interno, têm o dever de assegurar que os produtos comercializados estejam em conformidade com os critérios de segurança e qualidade exigidos pelos consumidores. Neste contexto o Brasil não tem deixado

a desejar a nenhum outro país. Hoje o Plano nacional de Controle de Resíduos (PNCR) é uma importante ferramenta para acompanhar de perto e garantir esse cumprimento.

Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento autoriza o uso de cerca de 15 compostos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal, e outros 50 para fins terapêuticos; muitos dos quais de uso comum entre as diversas espécies animais, como bovinos, suínos, aves, caprinos, etc. [6]

Hoje há mundialmente estabelecido o LMR para um grande número de substâncias, dentre elas antimicrobianos, como é o caso das sulfonamidas [19-21, 24, 27]. O LMR para os compostos da classe das sulfonamidas, por exemplo, segundo o guia do EMEA, é de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para tecidos animais podendo ser aplicada a todos os compostos do grupo das sulfonamidas. [19]

1.4 Uso de Antimicrobianos/Antibióticos na Produção Animal

O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928, numa cultura do fungo *Penicillium*. A demonstração que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos. No entanto, a primeira droga antibacteriana eficaz, testada e aprovada em humanos foi a sulfonamida. Foi em 1935 que Gerhard Domagk demonstrou que o corante vermelho prontosil (sulfonamida) apresentava atividade *in vivo* contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus*. [31]

Hoje os antibióticos correspondem a uma das classes de medicamentos mais prescritas. Este termo, antibiótico, é reservado para os agentes derivados de organismos vivos, ou compostos análogos sintéticos ou semi-sintéticos. [5]

Os antibióticos podem ser divididos em várias classes. Dentre estas, as classes β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos e quinolonas, são de longe, as mais importantes dentre as substâncias legais [32]. Muitas moléculas de antibióticos são compostas por um núcleo não polar combinado com grupos funcionais polares, sendo muitos anfífilos ou anfóteros. No entanto, as propriedades físico-químicas variam amplamente entre os compostos de diferentes classes estruturais. [34]

Atualmente os antibióticos são muito usados na medicina veterinária em níveis terapêuticos para prevenções (uso profilático), e no tratamento de infecções bacteriológicas, tais como, mastite e pneumonia em bovinos [32-35]. Estritamente falando da classe das Sulfonamidas (SAs), essas foram os primeiros agentes quimioterapêuticos sintetizados em

laboratório, representando um passo importantíssimo no tratamento de doenças bacterianas. Os quimioterápicos são substâncias químicas produzidas por síntese laboratorial, e que se introduzidas no organismo animal, agem de maneira seletiva sobre o agente causador do processo infeccioso, sem causar efeito adverso ao hospedeiro. Sulfas, trimetopim e quinolonas exemplificam esse grupo. [36]

SAs são agentes antimicrobianos que competem com o ácido p-amino-benzóico (PABA) na síntese enzimática do ácido fólico, o qual é necessário para a síntese de precursores dos ácidos nucleicos nas bactérias. Mais especificamente, as sulfonamidas são inibidores competitivos da di-hidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido di-hidropteroico, precursor imediato do ácido fólico. [37]

A estrutura principal de uma sulfonamida é composta por um anel benzênico, com um grupo amino e um grupo sulfonamida na posição *para*. As variações são dadas pela substituição do átomo de hidrogênio do grupo sulfonamida e/ou do grupo amino. Esta estrutura principal desempenha um papel importante para descrever sua forma de ação, pois o ácido para-aminobenzóico é bem semelhante à estrutura principal das Sulfas. Nas Figuras 2 e 3, encontram-se, respectivamente, a estrutura básica e as estruturas completas de algumas das moléculas de SAs, as quais foram objetos deste estudo.

Figura 2 - Estrutura básica das Sulfonamidas.

Figura 3 - Estrutura das Sulfonamidas estudadas: 1- Sulfametazina (SMT), 2- Sulfametoxazol (SMX), 3- Sulfacetamida (SCD), 4- Sulfadimetoxina (SDM), 5- Sulfamerazina (SMR), 6- Sulfadiazina (SDZ), 7- Sulfaquinoxalina (SQX), 8- Sulfaclorpiridazina (SCP), 9- Sulfametizol (SMZ), 10- Sulfatiazol (STZ).

As sulfonamidas são, portanto, agentes bacteriostáticos que atuam como antimetabólitos do ácido *p*-aminobenzoico, substrato para a di-hidropteroato sintetase bacteriana, impedindo a formação do di-hidropteroato e, consequentemente, do *N*5, *N*10-metileno-tetra-hidrofolato. [31]

A associação das sulfonamidas aos pirimidínicos (pirimetamina e trimetropim) apresenta efeito sinérgico, ou seja, ação contra agentes resistentes a drogas isoladas atuando em alvos específicos na síntese do DNA de bactérias. [5]

Na medicina humana, seu uso é limitado e muitas vezes não recomendado. No entanto na medicina veterinária são amplamente empregadas não apenas com fins terapêuticos e profiláticos, mas também atuam como promotores de crescimento, sendo adicionadas como

aditivos em rações de animais, como gados leiteiros, frangos e suínos a fim de manter o ganho de peso do animal, mesmo quando debilitados. [38, 39]

O uso desses medicamentos é de grande importância para a medicina veterinária, porém, apesar dos benefícios, prescrições não autorizadas, ou a não observância das instruções de uso por parte dos produtores, podem resultar em resíduos na carne e leite. Esses resíduos podem causar reações alérgicas em alguns indivíduos como hipersensibilidade ou, ainda, se consumidos por um longo período de tempo, podem causar resistência a microorganismos, além do risco cancerígeno [33, 34,40]. É importante salientar que a maioria das sulfas apresenta meia-vida relativamente longa, ocasionando sérios problemas para a saúde humana, entre os quais reações alérgicas ou tóxicas. [41]

Quando um produto de origem animal contendo microorganismos resistentes a antibióticos é consumido, estes microorganismos resistentes podem colonizar esse novo hospedeiro (homem) e passar a sua resistência antimicrobiana para outra bactéria já presente. Portanto o uso intensivo de agentes antimicrobianos em animais produtores de alimentos poderá desencadear o desenvolvimento de bactérias resistente aos mesmos, se tornando um sério problema para a saúde pública. [42]

Bosco e colaboradores (2000) avaliaram a sensibilidade antimicrobina do *Streptococcus suis* tipo II e verificaram percentuais de resistência de 3,57% para o cloranfenicol, cefalotina (3,57%), oxacilina (7,14%), ampicilina (7,14%), penicilina (3,57%), gentamicina (35,72%), tetraciclina (85,72%) e sulfazotrim (85,72%). O alto percentual de resistência para a tetraciclina e o Sulfazotrim, demonstra como a grande utilização de determinados agentes antimicrobianos, principalmente de amplo espectro de ação, contribui para o aparecimento de resistência. [43]

Num estudo realizado na década de 90 com resíduos de antibióticos e bactérias resistentes a drogas isoladas de carne bovina e de frango, Moreno e colaboradores, verificaram que tetraciclina estava presente em 23% dos frangos, com níveis de 480-1840 ng/g. Streptomicina, cloranfenicol e gentamicina estavam presentes, respectivamente, em 93%, 67% e 97% das amostras, porém em baixos níveis de concentração. Em frangos, 63% das amostras estavam contaminadas com resíduos de antibióticos, sendo que, streptomicina, cloranfenicol, gentamicina foram os mais comuns. [44, 45]

Estudos têm sugerido uma relação entre o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos e a emergência de patógenos humanos com susceptibilidade decrescente ou completamente resistente aos antibióticos [42]. Porém, especificamente no caso das sulfas a

Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, faz menção que não há qualquer evidência científica demonstrando que o desenvolvimento de reações alérgicas em indivíduos é decorrente da presença de resíduos de sulfonamidas nos alimentos [24]. Em contrapartida, segundo Montanaro (1998), algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se ainda que aproximadamente 5% dos pacientes humanos que são tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais. [46]

Segundo Souza e colaboradores (1998), o aparecimento de resistência a antibióticos e outras drogas antimicrobianas foi, é, e provavelmente continuará a ser, um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos. [44]

1.5 Preparo de Amostras

Considerando a complexidade de matrizes biológica e os baixos níveis dos constituintes de interesse, o pré-tratamento torna-se um passo crucial no procedimento analítico, já que o preparo da amostra pode não eliminar espécies interferentes, as quais poderão comprometer a determinação cromatográfica. Mesmo com os avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica altamente eficiente, o pré-tratamento da amostra continua a ser um importante passo, a fim de se obter resultados quantitativos e precisos. [47,48]

O preparo da amostra pode ser descrito como um processo de extração de resíduos químicos, a partir de uma amostra, e a subsequente purificação do extrato a fim de isolar os analitos de interesse e remover quaisquer interferentes da matriz que podem afetar o desempenho do instrumento analítico. [49]

Uma série de bons artigos de revisão tem descrito especificamente sobre o tema da preparação da amostra. Sendo assim, há na literatura diferentes métodos disponíveis para a determinação de resíduos de antibióticos em uma variedade de matrizes, mas muitos destes métodos são relativamente caros e demorados. Diante da complexidade de matrizes biológicas, como é o caso de alimentos, há a necessidade de minimizar o número de passos para reduzir o tempo e as fontes de erros. [40, 50-53]

Abordagens recentes sobre o pré-tratamento e/ou extração de resíduos e contaminantes nos alimentos apresentam diferentes metodologias tais como Extração com Fluido Supercrítico (SFE), Extração Líquida Pressurizada (PLE), Extração Assistida por Microondas

(MAE), Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), Extração em Fase Sólida (SPE), Microextração em Fase Sólida (SPME), Extração Sortiva em Barras de Agitação (SBSE), QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), e Micro Extração Empacotada por Sorbentes (MEPS). [40, 47-62]

A maioria das metodologias de preparo de amostras desenvolvidas atualmente segue o movimento no sentido do emprego de técnicas ambientalmente amigáveis, as quais enfatizam o uso de volumes menores de solventes e de amostras, como é o caso dos princípios do QuEChERS e MEPS [60-62]. Um preparo de amostra ideal pode reduzir o tempo de análise, fontes de erros, aumentar a sensibilidade e permitir a identificação inequívoca, confirmação e quantificação dos analitos [52]. A tendência desses métodos multiresíduo de preparo de amostras, é evitar a utilização de procedimentos de limpeza extensos, apesar da composição complexa de matrizes de tecidos de origem animal. [63-65]

Os métodos atuais envolvem o uso de uma ou a combinação de técnicas, tanto para a extração da amostra como os passos de limpeza, sendo mais comum a partição líquido-líquido, cromatografia de adsorção, cromatografia de permeação em gel, SPE, dispersão da matriz em fase sólida, como métodos de limpeza. [63, 66]

Segundo Blasco e colaboradores, mas de 70% dos métodos publicados nos últimos anos para a extração de antibióticos em matrizes animais abordam a extração com solvente – exemplo acetonitrila acidificado ou não – seguida por uma etapa de clean up por SPE dispersiva (DSPE) ou a extração com líquido pressurizado (PLE), usando água como solvente, com ou sem a limpeza por SPE. [63]

1.5.1 Extração com Solvente (LLE)

Até recentemente dentre os métodos mais tradicionais de preparo de amostra, a Extração com solventes (extração líquido-líquido, LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) era a técnica mais utilizada para o preparo de amostra. Esta se baseia na solubilidade dos analitos presentes em dois solventes, sendo esses idealmente imiscíveis. [67] A LLE apresenta as vantagens de ser simples e poder utilizar um número grande de solventes, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade. Por outro lado, é tediosa, cara, utiliza grandes volumes de solvente orgânicos, pode formar emulsões, é de difícil automação, apresenta baixa repetibilidade e reprodutibilidade em decorrência das varias etapas de extração. [67,58]

Apesar destas desvantagens, a LLE é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em matriz biológicas, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com boa seletividade para alguns analitos. [67-69]

1.5.2 Extração em Fase Sólida (SPE)

Visando eliminar muitos dos problemas decorrentes do uso da LLE surgiu em meados da década de 70, como alternativa a LLE, a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*). Mesmo hoje em dia a extração em fase sólida é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas. [67] A Extração em fase sólida tem surgido como alternativa a líquido-líquido, devido à simplicidade de extração, baixo custo e fácil automatização. [60]

O princípio da SPE é semelhante ao de extração líquido-líquido (LLE), envolvendo uma partição de solutos entre as duas fases. No entanto, ao invés de duas fases líquidas não miscíveis, como na LLE, a SPE envolve partição entre um líquido (amostra ou solvente com analitos) e uma fase sólida (sorbente). [70] Os mecanismos de retenção da SPE são baseados naqueles desenvolvidos em cromatografia líquida de baixa pressão - em coluna. [67]

Essa técnica de tratamento de amostra permite a concentração e purificação dos analitos, a partir de uma solução, por adsorção sobre um adsorvente sólido e purificação do extrato após a extração. O procedimento geral é o de carregar a amostra para a fase sólida da SPE, limpeza do adsorvente para retirar componentes não desejados e, em seguida, eluição e coleta dos analitos de interesse com um solvente adequado (Figura 4). [70]

Os procedimentos de extração em fase sólida são utilizados não só para extrair vestígios de compostos orgânicos a partir de amostras ambientais e biológicas, mas também para remover os componentes interferentes de matrizes complexas, a fim de obter um extrato limpo contendo os analitos de interesse.

Figura 4 - Sequência típica de Extração em Fase Sólida (SPE).

Fonte: EUROPEAN MYCOTOXINS AWARENESS NETWORK. Sample Preparation Techniques for the Determination of Mycotoxins, 2012. Disponível em: <<http://www.mycotoxins.com/>>. Acesso em: 11 set 2012.

Um dos parâmetros mais importantes desta técnica é a escolha da fase sólida. Atualmente existem muitos sorbentes disponíveis comercialmente e dentre eles destaca-se os sorbentes a base de sílica quimicamente ligada (fase normal, fase reversa e troca iônica).

A Tabela 1 destaca as fases extratoras mais comuns disponíveis comercialmente. Os analitos são divididos em dois grupos: solúveis em solvente orgânico e os solúveis em água. Os solúveis em solvente orgânico são classificados de acordo com sua polaridade, enquanto que os solúveis em água são classificados como iônicos e não iônicos.

A SPE tem muitas vantagens em comparação com as técnicas tradicionais de preparo de amostra (extração líquido-líquido, por exemplo), tais como: as recuperações são mais elevadas, obtenção de extratos altamente purificados, capacidade de extrair simultaneamente analitos com uma ampla faixa de polaridade, a facilidade de automação, redução no volume de solvente orgânico. O desenvolvimento de adsorventes mais seletivos também tem possibilitado procedimentos simplificados e uma minimização de erros.

Tabela 1 - Fases sorbentes mais utilizados em SPE para analitos orgânicos com massa molecular < 2.000 Daltons.

POLARIDADE DO SOLVENTE		FASE ESTACIONARIA	ELUENTE
Solúvel em solvente orgânico			
Polar (metanol, acetonitrila, acetato de etila)		Amino (NH ₂) 1°, 2° amino (NH ₂ / NH) Ciano (CN) Diol (COHCOH)	Hexano Clorofórmio Diclorometano Acetona Metanol
	Moderadamente polar	Alumina (Al ₂ O ₃) Sílica Gel (SiO ₂) Florisil (Mg ₂ SiO ₃)	Hexano Clorofórmio Diclorometano Acetato de etila Metanol
	Não polar (hexano, heptano, éter etílico)	Octadecila (C18) Octila (C8) Cicloexila (C ₆ H ₁₂) Fenila (C ₆ H ₆)	Hexano Diclorometano Acetona Acetonitrila Metanol Água
Solúvel em água			
Iônica	Catiônico	Ciano (CN) Ácido carboxílico (COOH) Ácido sulfônico (C ₆ H ₆ -SO ₃ H)	Ácidos Bases Tampões
	Aniônico	Amino (NH ₂)	Ácidos Tampões
	Polar	Ciano (CN) Diol (COHCOH) Amino (NH ₂)	Hexano Clorofórmio Diclorometano Acetona Metanol
Não iônica	Moderadamente polar	Silica gel (SiOH) Florisil (Mg ₂ SiO ₃) Alumina (Al ₂ O ₃)	Hexano Clorofórmio Diclorometano Acetato de etila Metanol
	Não polar	Octadecil (C ₁₈) Octil (C ₈) Ciclohexil (C ₆ H ₁₂) Fenil (C ₆ H ₆) Ciano (CN)	Hexano Diclorometano Acetona Acetato de etila Metanol Água

Fonte: LANÇAS, F. M. **Extracao em Fase Solida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 93 p.

1.5.3 Extração por Dispersão da matriz em Fase Sólida (MSPD)

Outra técnica de preparo de amostra de grande aplicação, e particularmente efetiva, é a Extração por Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *solid phase dispersion*), reportada primeiramente em 1989 por Baker e colaboradores. [67] A MSPD usa um suporte sólido, geralmente contendo uma fase quimicamente ligada (por exemplo, C₁₈), como abrasivo para conduzir a ruptura na estrutura da amostra, facilitando o processo de extração, em seguida lavagem e eluição com pequeno volume de solvente (Figura 5). A MSPD fornece tanto uma estrutura porosa para permitir que o solvente penetre na matriz e extrair os analitos, como também tem algumas funcionalidades que podem reter os lipídios. [52, 67]

Segundo estudos realizados por Baker e colaboradores alguns fatores que afetam a Dispersão da Matriz em Fase Sólida são: a natureza do suporte sólido (tamanho do poro, base de sílica, ou polimérica), a natureza química da fase ligada ao suporte (fase reversa, fase normal, com ou sem pré-condicionamento da fase), a natureza da amostra, alterações na matriz (ajuste de pH), etc. [67]

Figura 5 - Sequência do procedimento MSPD.

Fonte KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current Trends in sample preparation for growth promoter and residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

Esta técnica usa menos solvente do que a LLE e pode eliminar a necessidade de múltiplos passos no processo de extração. Vários trabalhos detalhando a aplicabilidade da MSPD em análises de resíduos em alimentos têm sido reportados. As aplicações incluem extrações de pesticidas em frutas e vegetais, leites, carnes, ovos e peixes. [72-75]

Embora a MSPD possa promover extratos limpos o suficiente para análise instrumental, um passo adicional de clean-up, é requerido principalmente quando se trata de matrizes com alto teor de gordura. [52]

1.5.4 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

Mais recente, a Extração com Líquido Pressurizado (PLE, do inglês, *Pressurised Liquid Extraction*) também conhecida como Extração Acelerada com Solvente (ASE, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*) tem surgido como alternativa para o processo de extração, pois frequentemente um grande numero de amostras necessita ser analisadas e, portanto, métodos rápidos para o processo de extração são importantes.

A PLE é um sistema automatizado de extração de líquido pressurizado para análise rápida de diferentes tipos de resíduos como: dioxinas, PCBs, pesticidas, PAHs, em amostras ambientais, biológicas e de alimentos. A Extração Líquida Pressurizada envolve a extração com solventes líquidos, porém em elevadas temperaturas e pressão (Figura 6). [49] Os solventes são levados para a região próxima ao estado supercrítico, onde os mesmos apresentam melhores propriedades de extração. Assim, a PLE apresenta vantagens como, aumento da solubilidade do analito e maiores velocidade de extração. Temperaturas mais elevadas aceleram o processo de extração devido à viscosidade e a tensão superficial diminuírem, enquanto a solubilidade e a taxa de difusão da amostra aumentam. A pressão tem menor influência sobre a recuperação dos analitos do que a temperatura, mas as elevadas pressões mantêm o solvente no estado líquido mesmo empregando temperaturas acima do ponto de ebulição, e isto ajuda o transporte do solvente através da amostra e reduz o consumo de solvente. [52, 76]

Figura 6 - Esquema do procedimento de Extração Líquida Pressurizada da Dionex ASE™ (PLE).

Fonte KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current Trends in sample preparation for growth promoter and residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

Originalmente, a utilização da técnica de extração de líquido pressurizado (PLE), focava na extração de poluentes ambientais presentes em amostras de solo, sedimentos e lodo. No entanto, mais recentemente, as vantagens desta técnica estão sendo exploradas em diversas áreas, incluindo biologia, indústrias farmacêuticas e de alimentos. Atualmente a PLE tem sido usado no preparo de amostras para determinação de pesticidas em peixes, antibióticos em carne e leite, agentes antimicrobianos em ovos. [78-80]

1.5.5 Microextração em Fase Sólida (SPME)

Outras técnicas como as de extração com sorção, baseadas em equilíbrios de distribuição entre a matriz da amostra e uma fase líquida não-miscível também tem apresentados bons resultados para análises de antibióticos em alimentos.[81] A Microextração em Fase Sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) e a Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*) são as mais conhecidas. Em ambos os casos, as matrizes são principalmente aquosa e a fase não-miscível (por exemplo,

polidimetilsiloxano, PDMS), é, muitas vezes, revestida sobre um suporte sólido. Ao contrário das técnicas de adsorção (tal como SPE), em que os analitos ligados a sítios ativos na superfície, o volume total da fase de extração é importante. Extração de analitos depende do coeficiente de partição de solutos entre as fases. [52]

Especificamente no caso da SPME, essa é uma técnica moderna introduzida em 1990 por Pawliszyn e colaboradores como uma técnica de pré-concentração. Nesta técnica é empregada uma fibra ótica, de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero (por exemplo, polidimetilsiloxano, poliacrilato ou carbowax) ou de um adsorvente sólido (por exemplo, carvão ativo micro-particulado). Esta fase extratora (fibra) é acondicionada dentro da agulha de uma micro-seringa, para a extração dos analitos. [52, 82,83]

A extração pode ser feita pela simples exposição da fibra e mergulhando diretamente na solução da amostra. Durante a extração a amostra é agitada e o tempo é controlado.

Os analitos são concentrados por um tempo pré-determinado e, após esta etapa, a fibra é recolhida para dentro da agulha ou através da técnica de “headspace”, na qual a amostra é frequentemente aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos na fibra. Após a extração os analitos presentes na fibra são dessorvidos, usualmente por cromatografia gasosa, onde os componentes da amostra são termicamente dessorvidos (Figura 7). [52, 82]

Figura 7 - Sequência típica de SPME.

Fonte: VALENTE, A. L P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v.23, p.523-530, 2000.

A SPME tem a vantagem do procedimento do método analítico ser mais simples e rápido que a LLE e a SPE; na maioria das vezes os extratos obtidos são mais limpos, redução no uso solvente, capacidade de análise de amostras menores. Ela também pode ter alta sensibilidade e pode ser usada com analitos polares e não polares, em diferentes matrizes, podendo ser usado tanto GC como LC. No primeiro caso os analitos necessitam ser voláteis e termicamente estáveis para que sejam dessorvidos e determinados por cromatografia gasosa. No segundo os analitos também podem ser extraídos (dessorvidos) da fibra com eluente para análise em cromatografia líquida. No entanto uma desvantagem dos dispositivos de *in-tube* é que as partículas têm de ser removidas das amostras antes da extração (por filtragem ou centrifugação). [52]

Este método tem sido revisado e vários artigos têm sido publicados reportando o uso deste sistema em matrizes biológicas. Por exemplo, Yi Wen e colaboradores, desenvolveram um método *on line* para a determinação simultânea de resíduos de tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC) e doxiciclina (DC) em músculo de peixe, através do acoplamento *in-tube SPME* e cromatografia líquida (HPLC) com um detector de arranjo de diodos. Os limites de detecção para a tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina foram 22, 16, 30 e 21 ng/g, respectivamente. [81]

Podemos destacar aqui as mais diferentes abordagens para o preparo de amostras. Essas diferentes abordagens resultaram em novas possibilidades e vantagens no tratamento da amostra como, por exemplo, uma redução substancial no tempo de extração e a incorporação de sistemas “on-line” de análise em fluxo. Cada técnica tem suas vantagens e desvantagens e a escolha deve depender da análise, do problema e do objetivo do cliente.

É importante salientar que um processo de preparo de amostra eficaz é essencial para alcançar bons resultados analítico. Uma metodologia de preparo de amostra ideal deve ser rápida, exata, precisa e exige a integridade da amostra.

1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) - Análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

A cromatografia é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido (fase móvel) e um adsorvente (fase estacionária). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido depositado num sólido inerte, empacotado numa coluna ou espalhado por uma superfície formando uma camada fina. As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, especialmente para

análises de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como alimentos, produtos naturais, sedimentos, e outros. [84, 85]

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (em inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação cromatográfica, que se distingue por usar uma fase móvel à alta pressão. A HPLC teve seu desenvolvimento somente no final da década de 60 e início da década de 70. O desenvolvimento da HPLC foi favorecido pelo interesse nas análises de compostos os quais não eram possíveis por cromatografia gasosa. [85]

Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, a cromatografia líquida é denominada de cromatografia de fase normal. Ao contrario, quando a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente, a cromatografia recebe a denominação de cromatografia de fase reversa.

O modo mais comum de operação da HPLC é a Fase Reversa (RP), sendo que essa é altamente compatível com a análise de fármacos. A HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste em uma fase estacionária apolar e uma fase móvel de polaridade moderada. Em geral a cromatografia líquida de fase reversa utiliza partículas de sílica como suporte para ligação da fase de interesse. Os adsorventes utilizados na cromatografia de fase reversa são substâncias polares quimicamente ligadas, tendo como grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil , amino ou apolares. As Cadeias alquílicas (por exemplo, C₁₈) ligada aos suportes de sílica são os adsorventes mais empregados.

O principal mecanismo de separação em RP-HPLC é a partição dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. Nesse equilíbrio de partição os compostos menos polares são os mais retidos na fase estacionária alquílica. Fenômenos de adsorção também estão presentes entre os mecanismos de retenção. Assim, compostos básicos são comumente afetados pela adsorção em grupos silanóis residuais de fases estacionárias que não apresentam um recobrimento/desativação completo desses grupos. [86]

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é uma das técnicas mais utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. No que diz respeito às determinações de contaminantes em alimentos, as técnicas cromatográficas de separação destacam-se no âmbito analítico pela reconhecida capacidade de possibilitarem análises qualitativas e quantitativas. [84]

Em cromatografia líquida (HPLC), empregam-se diferentes tipos de detectores como, por exemplo, detectores com Índice de Refração, Ultravioleta, Espalhamento de Luz,

Fluorescência, Massas, e outros, os quais permitem a análise quantitativa dos componentes das misturas. [85]

1.6.1 Espectrofotometria eletrônica na região do Ultravioleta-visível (LC-UV/Vis)

O funcionamento dos detectores espectrofotométricos baseia-se na absorbância de luz por parte da amostra ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética; normalmente isto ocorre no ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda.

Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o de comprimento de onda variável (espectrofotômetro), que não só é de aplicação mais variada e sensível, mas também é caro, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixo.

Os detectores por UV-vis são seletivos, pois só detectam os compostos que absorvem no comprimento de onda em que o detector for ajustado. No entanto, os espectros obtidos para amostras complexas muitas das vezes não fornece dados conclusivos, isto se dá devido à falta de especificidade do detector de UV-Vis e a similaridade entre vários compostos em análises. [84]

Os detectores de UV-Vis são menos seletivos quando comparado aos detectores de massas, pois os interferentes da matriz e/ou outros analitos que apresentam absorção num mesmo comprimento de onda e/ou apresentam mesmo tempo de retenção que os analitos de interesse podem coeluir durante o processo de separação cromatográfica e interferir nas análises. Ainda assim, a detecção por ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma alternativa a espectrometria de massas, por ser simples e de baixo custo.

Trabalhos recentes têm dado destaque ao uso da HPLC-UV, como técnica de separação e identificação em análises aflotoxinas em leite, ovos, carne; tetraciclinas em carnes, e fígado; cloramfenicol em frutos do mar, carnes e mel; clenbuterol em tecidos de porcos; anfenicois e penicilinas em tecido de peixe; e muitos outros. [87-91]

Todos estes trabalhos, e muitos outros não citados, mostram que estudos envolvendo um preparo de amostra mais eficiente e otimização do desenvolvimento cromatográfico são extremamente importantes para o sucesso da cromatografia líquida com detecção por UV-Vis.

1.6.2 Espectrometria de Massas in tandem (LC-MS/MS)

Mesmo sendo uma técnica excelente para separação, a HPLC necessita de uma técnica confirmatória quanto à identidade dos compostos (análise qualitativa). Dentre as várias opções existentes atualmente, a espectrometria de massas (MS) é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias. [69]

A Espectrometria de Massas permite uma visão global dos constituintes de diversos alimentos e sua aplicação possui crescente interesse na indústria alimentícia. A MS também pode ser utilizada como ferramenta no controle de qualidade de alimentos, bem como no controle de fraudes e de adulterações.

Nos últimos anos, a aplicação da técnica de LC-MS tornou-se uma importante ferramenta analítica, em função da combinação entre a aplicabilidade da LC aliada à grande capacidade de detecção dos analisadores MS. Desta forma, este acoplamento possibilitou o desenvolvimento de métodos que possuem como características maior seletividade, sensibilidade e especificidade. [92] O acoplamento espectrometria de massas com a cromatografia líquida (LC-MS) por meio de fontes de ionização específicas para LC, possibilitaram o uso da técnica de MS em análises rotineiras de determinação de resíduos e contaminantes em alimentos.

Os sistemas de ionização que tiveram maiores sucesso na GC-MS, como impacto de elétrons (EI) e ionização química (CI) não se apresentaram como adequadas a LC, pois essas fontes de ionização operam em baixas pressões (“vácuo”); assim, mais recentemente foram desenvolvidas fontes de ionização específicas para a LC.

As fontes de ionização mais utilizadas no acoplamento com a LC, as quais operam a pressão atmosférica, são respectivamente: Eletrospray (ESI, *eletrospray ionization*), Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), Ionização por Ftons a Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Photon Ionization*). Dentre estas a ESI é a forma de ionização mais empregada no acoplamento LC-MS. [84]

Particularmente falando do acoplamento LC-MS com ionização pelo processo eletrospray, esse tem se difundido às mais diversas áreas da ciência. A importância desta técnica é refletida pelo número crescente de artigos publicados que utilizam a técnica, seja para simples determinação do peso molecular e/ou quantificação de uma substância ou mesmo em estudos de determinação estrutural.

O processo de ionização por Eletrospray permite a criação de íons na pressão atmosférica ao invés de “vácuo”. Neste processo, a amostra é dissolvida em um solvente, usualmente não polar, e pressurizada em um tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000-5.000 V. Consequentemente, o líquido emerge do capilar na forma de um aerossol a pressão atmosférica. As gotículas formadas perdem, sucessivamente, o solvente, ou seja, são dessolvatadas, e os íons são direcionados para o espectrômetro de massas induzidos pela atração eletrostática. A Figura 8 apresenta um desenho básico de uma interface para LC-MS utilizando a ionização via *Eletrospray*. [84]

O espectrômetro de massas pode combinar sensibilidade, versatilidade e universalidade, e seu potencial de utilização é muito grande. A maior dificuldade de utilização deste detector com o sistema HPLC é o seu alto custo quando comparado aos outros detectores usados na cromatografia líquida. Neste contexto, a MS é uma técnica analítica que apresenta rapidez e sensibilidade adequadas para atender as necessidades das agências reguladoras as quais buscam tecnologias eficientes e sensíveis para detectar possíveis resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes em alimentos.

Para análises de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, a MS fornece resultados sensíveis e confiáveis. Rotineiramente equipamentos de LC-MS-MS permitem a detecção e a quantificação de centenas de drogas em uma única análise. É importante salientar que segundo a decisão 657/2002/EU, a técnica de referência recomendada na maioria dos casos é a LC-MS-MS por ser rápida, sensível e seletiva. Além disso, é uma técnica auto-confirmatória, que evita a emissão de laudos com resultados falsos positivos ou falsos negativos. [93]

Nos últimos anos, a espectrometria de massas com ionização por “electrospray” (ESI-MS) tem sido extensivamente empregada. Dados da literatura reportam a utilização da técnica para as mais diversas áreas, podendo-se destacar a determinação de resíduos de agrotóxicos em água e alimentos, identificação de produtos de relevância ambiental, mapeamento proteômico, *screening* de drogas, adulteração de bebidas, entre outros. [94]

Figura 8 - Interface do tipo *Electrospray* utilizada para o acoplamento LC-MS. Destaque para a formação dos íons no processo que são conduzidos para o contraprato pelo campo elétrico aplicado.

Fonte: LANÇAS, F. M. A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatografica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

A técnica de LC-ESI-MS foi utilizada por Horie e colaboradores na determinação de antibióticos macrolídeos como a eritromicina, josamicina, espiramicina, tilmicosina, tilosina e outras em carne com recuperações de 70,4-93,2%, e com elevada precisão. Os limites de quantificação das drogas na carne e peixe foram de 0,01 mg/g [95]. Num outro estudo, Zeleny e colaboradores relataram o uso do LC-MS com fonte de ionização por electrospray para a detecção e a quantificação simultânea de compostos de nitroimidazol (droga utilizada contra protozoários e para combater infecções bacterianas) presentes em carne de porco, com recuperação ao nível de 1 mg/kg na faixa de 100% para todos os analitos, repetibilidades e precisões intermediários de 4-12% e 2-9%, respectivamente [96]. Outro trabalho de

identificação e de quantificação de drogas usadas no combate a infecções ocasionadas por bactérias e coccídeos, utilizando LC-MS, foi feito por Li e colaboradores. Esses autores desenvolveram e validaram uma metodologia para analisar sulfadimetoxina e seu metabólito (N-acetilsulfadimetoxina) em amostras de plasma, de urina e de fluido oral, além de rim e fígado de bovinos. Os limites de quantificação para ambos os analitos nessas amostras foram de 2, 100 e 5 mg/L no plasma, na urina e no fluido oral, respectivamente. Já nas amostras de rim e de fígado, os limites de quantificação foram de 10 µg/kg. [97]

Portanto, devido à complexidade de matrizes de origem animal, a quantificação na sensibilidade requerida por meio das técnicas analíticas clássicas é difícil e torna o preparo de amostra trabalhoso. Assim, a utilização de espectrômetros de massas com fonte de ionização por *electrospray* ou de ionização química à pressão atmosférica se tornaram a alternativa mais “viável” para atender à legislação vigente e garantir a inocuidade desses alimentos, atendendo as exigências do mercado interno e externo.

1.7 Validação do Método Analítico

A validação do método analítico é feita para garantir que a metodologia analítica é exata, reprodutível e flexível sobre uma faixa específica de concentração que uma substância será analisada. É uma avaliação que garante a conformidade com as exigências legais ou fim proposto (interesse de terceiros) do método analítico. O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que os dados obtidos pelo método desenvolvido são confiáveis, sendo, portanto, adequado para o seu propósito. [98-100]

Vários órgãos regulamentadores definem validação de métodos. Conceitos estão em contínua evolução. O Ministério da Agricultura e Abastecimento em seu guia para validação de métodos analíticos define como sendo:

“A validação metodológica é a garantia experimental documentada de que o método é adequado a finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados” (MAPA).[101]

Recomendações também podem ser encontradas em muitos outros guias oferecidos por órgãos regulamentadores, tais como, Codex Alimentarius, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), e a Food and Drug Administration (FDA). [102-104]

Diferentes objetivos de controle exigem diferentes categorias de métodos. Alguns parâmetros de desempenho requeridos pela União Européia (Decisão 657/2002) em seu guia são descritos a seguir.

1.7.1 Especificidade/Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir, com confiança, um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e constituintes da matriz. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Uma forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão) sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra [99, 104-107]

1.7.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico demonstra a capacidade de se obter resultados que são diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro de uma dada faixa. É usualmente expressa em termos da variância em torno da inclinação da reta de regressão linear, calculada a partir de resultados obtidos na análise de amostras com diferentes concentrações do princípio ativo, de acordo com a relação matemática estabelecida através do método dos mínimos quadrados. A inclinação da reta de regressão e sua variância fornecem uma medida matemática da linearidade, enquanto que a intersecção é uma medida da tendência do método. Curva de calibração é a relação entre a resposta de um instrumento e a quantidade (massa, volume, concentração) de um analito.

1.7.3 Recuperação/Exatidão

A exatidão de um método analítico expressa o grau de concordância entre o valor convencionalmente verdadeiro e o valor encontrado. Ela evidencia a eficiência da extração de um método analítico e geralmente é determinada por intermédio do uso de uma amostra certificada, cuja concentração do analito é conhecida ou quando não disponível é expressa como porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida através da comparação dos

resultados analíticos de amostras em branco acrescidas de padrão dos analitos em estudo, e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

Para os cálculos de recuperação utiliza-se a seguinte equação:

Equação 1:

$$Rec\% = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100$$

Onde: x_i é o valor da concentração experimental e x é o valor da concentração nominal da determinação.

1.7.4. Precisão

É a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade e da reprodutibilidade.

Repetibilidade: É a precisão intracorrída, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Reprodutibilidade: Também denominada precisão intermediária, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras, se necessário [100, 104].

Para os cálculos dos parâmetros de precisão utilizou-se as seguintes equações:

Média Aritmética: determinada pela equação 2.

Equação 2:

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Onde:

$\bar{X}$ = média aritmética dos valores; x = valor obtido; n = números de resultados obtidos.

- **Desvio Padrão (s):** utilizando o cálculo da média, a estimativa do desvio padrão é determinada pela equação 3.

Equação 3:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão

- **Coefficiente de Variação (CV):** determinado pela equação 4

Equação 4:

$$CV = \frac{s}{média \times 100}$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão

1.7.5 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Um método analítico deve ser caracterizado pelo limite de decisão ($CC\alpha$) e pela capacidade de detecção ($CC\beta$). O conceito de limite de decisão e capacidade de detecção foi introduzido pela norma ISO 11843 com o objetivo de propor um método para determinar o limite a partir do qual um sistema pode ser declarado diferente do seu estado básico. Na prática, $CC\alpha$ e $CC\beta$ permitem caracterizar as duas principais fontes de variabilidade de sinais, ou seja, proveniente do ruído (principalmente dependente da seletividade do método) e da medida (principalmente dependente da repetitividade/reprodutibilidade do método).

Limite de Decisão ($CC\alpha$): é o Limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de α (erro α , probabilidade de a amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme - falso positivo).

Capacidade de Detecção ($CC\beta$): Teor mais baixo de substancia que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada numa amostra com uma probabilidade de erro de β (erro β , probabilidade de a amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido

um resultado conforme - falso negativo). Em caso de substâncias as quais não se encontre definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de $(1-\beta)$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, a capacidade de detecção é a concentração no limite permitido com uma certeza estatística de $(1-\beta)$.

1.7.5.1 Procedimento de Determinação do $CC\alpha$ e $CC\beta$

Os cálculos do $CC\alpha$ e $CC\beta$ devem ser realizados, preferencialmente, utilizando os procedimentos da curva de calibração matrizada, de acordo com a série de normas ISO 11843.

Limite de Decisão ($CC\alpha$) para Substâncias Permitidas ($\alpha = 5\%$):

É calculado através da equação 5, utilizando os dados dos pontos da curva de calibração matrizada, fortificados na concentração do LMR definido.

Equação 5:

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times \sigma$$

Em que: σ é desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial.

Capacidade de Detecção ($CC\beta$) para Substâncias Permitidas ($\beta = 5\%$):

Uma vez calculado $CC\alpha$ para as substâncias permitidas, $CC\beta$ é calculado através da seguinte equação:

Equação 6:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times \sigma$$

Em que: σ é desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Bovino e Bubalinos**. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/ministerio>>. Acesso em: 10 jun. 2012.
- [2] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Exportações de Carne Bovina do Brasil**. 2012. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 22 out. 2012.
- [3] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORAS DE FRANGO (UBABEF). **Relatório Anual Ubabef 2012**. 2012. Disponível em: < <http://www.abef.com.br> >. Acesso em: 22 out. 2012.
- [4] BEEF POINT. USDA: produção mundial de carne bovina cresce 13% em 20 anos, brasileira cresce 65%. 2012. Disponível em: <<http://beefpoint.com.br>>. Acesso em: 01 nov. 2012.
- [5] DE BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; VANDEN BUSSCHE, J.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CROUBELS, S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7964-7976, 2009.
- [6] REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.
- [7] BENELUX. **Wat is de Benelux?**. 2012. Disponível em: <http://www.benelux.int/nl/home_intro.asp>. Acesso em: 22 nov. 2012.
- [8] STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 15-53, 2005.
- [9] HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; LÜTZHOFT, H. C. H.; JORGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. **Chemosphere**, v. 36, p. 357-393, 1998.
- [10] BACCARO, M. R.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 69, p.15-18, 2002.
- [11] LAPCHIK, M. S.; NISHIURA, J. L.; HEILBERG, I. P.; PANCOTTI, S. L.; AJZEN, H.; SCHOR, N. Tratamento da Infecção Urinária não Complicada (ITU): estudo comparativo entre a Ciprofloxacina (CIPRO) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (SZM+TMP) com 2 esquemas de duração terapêutica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.17, p. 31-34, 1995.

- [12] BLATT, J. M.; MIRANDA, M. C. Perfil dos microorganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 7, p.10-14, 2005.
- [13] VEJA. **Sementes germinadas causaram contaminação por E. coli**. 2011. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/noticia/saude/sementes-de-soja-sao-responsaveis-por-contaminacao-de-e-coli>. Acesso em: 12 out. 2012.
- [14] EXAME. **Sobe para 28 o número de vítimas de melões contaminados nos EUA**. 2011. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/mundo/noticias/sobe-para-28-o-numero-de-vitimas-de-melo-es-contaminados-nos-eua>. Acesso em: 12 out. 2012.
- [15] VEJA. **Nova superbactéria preocupa os cientistas**. 2012. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/noticia/saude/nova-superbacteria-preocupa-os-cientistas>. Acesso em: 22 de out 2012.
- [16] FOLHA. **Doença surgiu na Inglaterra, na década de 1980**. 2010. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/fsp/ribeirao/ri0901201005.htm>. Acesso em: 12 out. 2012.
- [17] ESTADÃO. **Alemanha detecta nível excessivo de dioxina em aves**. 2011. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/internacional,alemanha-detecta-nivel-excessivo-de-dioxina-em-aves,663704,0.htm>. Acesso em: 12 out. 2012.
- [18] DEUTSCHE WELLE. **Ração pode ter contaminado aves e porcos na Alemanha**. 2002. Disponível em: <http://www.dw.de/ra%C3%A7%C3%A3o-pode-ter-contaminado-aves-e-porcos-na-alemanha/a-408109>. Acesso em: 12 out. 2012.
- [19] EUROPEAN MEDICINE AGENCY. **European Public Assessment Reports**. 2012. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/ema/>>. Acesso em: 19 jun. 2012.
- [20] COUNCIL REGULATION (EEC). L22418 august 1990 council regulation 2377/90/EC of 26 june 1990 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Communities**, L 224, p. 1-8, 1990.
- [21] EUROPEAN MEDICINE AGENCY. **Guidance on Validation of Bioanalytical Methods**. London, 2009. 22 p.
- [22] EUROPE UNION. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996. **Official Journal of the European Communities**, L 125, p. 0010-0032, 1996.
- [23] BRASIL. Presidência da República. Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dezembro de 1950. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L1283.htm>. Acesso em: 11 set. 2012.
- [24] BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br.>>. Acesso em: 08 nov. 2012.

- [25] BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 30.691. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 de jul. 1952. nº 155, Seção I-Parte I, p. 10.785.
- [26] SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência Saúde Coletiva**, v.14, n.6, 2009
- [27] BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 86, de 26 de Janeiro de 1979. Aprova o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 fev. 1995. Seção 1, p. 1913.
- [28] BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 51. Instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 fev. 1986. Seção 1, p. 2228
- [29] BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 527. Atribuição ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB. **Diário Oficial da União**, 16 de agosto de 1995. Seção 2, p. 6048.
- [30] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/ANIMAL). 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 out. 2012.
- [31] GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.
- [32] GRANELLI, K.; BRANZELL, C. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, v. 586, p. 289-295, 2007.
- [33] KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WIDMER, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-µm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, **Journal Chromatography A**, v. 1194, p. 66, 2008.
- [34] THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, 166:145-167, 2003.
- [35] BLASCO, C.; DI CORCIA, A.; PICÓ, Y. Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 116, p.1005, 2009.
- [36] PALERMO-NETO, J. O problema do uso inadequado de antibióticos na produção de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, p.S199-S208, 2007.
- [37] GILMAN, G. A.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 504.

- [38] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, L. 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.
- [39] STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1-2, p. 15-33, 2005.
- [40] SCHNEIDER, M. J.; MASTOVSK, K.; LEHOTAY, S. J.; LIGHTFIELD, A. R.; KINSELLA, B.; SHULTZ, C. E. Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. **Analytical Chimica Acta**, v. 637, p. 290-297, 2009.
- [41] SVENSSON, C. Drug hypersensitivity: where do we stand. **AAPS Journal**, v. 8, p. E236-E238, 2006.
- [42] MOTA, R. M.; SILVA, K. P. C. S.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- [43] BOSCO, S. M. G.; PEZERICO, S.B.; CABRAL, K. G.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Streptococcus suis tipo II em suínos e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 157-160, 2000.
- [44] SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Revista Ciência Hoje**, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.
- [45] VÁSQUEZ-MORENO, L.; LANGURÉ, A.; HIGUERA-CIAPARA, I.; AGUAYO, M. D.; FLORES, E. Antibiotic residues and drugs resistant bacteria in beef and chicken tissues. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 3, p. 632-635, 1990.
- [46] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p. 843-850, 1998.
- [47] TADEO, J.L; SÁNCHEZ-BRUNETE, C; PÉREZ, R.A.; FERNÁNDEZ, M. D.; J. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p.175-191, 2000.
- [48] PICÓ, Y.; FONT, G.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J., Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 153-173, 2000.
- [49] KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current Trends in sample preparation for growth promoter and residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.
- [50] BULDINI, P.L.; RICCI, L.; SHARMA, J.L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 47- 70, 2002.

- [51] YU, C.; COHEN, L. H. Tissue Sample Preparation-Not the Same Old Grind. **LC GC Europe**, v. 17, p. 1- 6, 2004.
- [52] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-53, 2007.
- [53] CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191-219, 2008.
- [54] LEHOTAY, S.J. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. **Journal of Chromatography A**, v.785, p. 289-312, 1997.
- [55] OBANA, H.; AKUTSU, K; OKIHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; HORI S. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using a high capacity absorbent polymer for water. **Analyst**, v. 124, p. 1159-1165, 1999.
- [56] RICHTER, B. E.; HOEFLE, F.; LINKERHAEGER, M. Determining organophosphorus pesticides in foods using accelerated solvent extraction with large sample sizes. **LC-GC**, v. 19, p. 408-412, 2001.
- [57] ADOU, K.; BONTOLYAN, W. R.; SWEENEY, P. J. Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by Accelerated Solvent Extraction and Capillary Gas Chromatography. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 49, p. 4153-4160, 2001.
- [58] LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p.1663-1683, 2007.
- [59] LEHOTAY, S. Determination of pesticide residues in non fatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry: collaborative study. **Journal of AOAC**, v. 85, p.1148, 2002.
- [60] ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC**, v. 86, p. 412-431, 2003.
- [61] SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 22, p. 1656-1661, 2011.
- [62] ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. **Analytical Chimica Acta**, v.701, p. 119-128, 2011.
- [63] BLASCO, C.; MASIA, A.; MORILLAS, F.G.; PICÓ, Y. Procedures for antibiotic residues in bovine muscle tissues. **Journal of AOAC**, v. 94, p. 991-1003, 2011.

- [64] MOL, H.G.J.; BOLANOS, P. P.; ZOMER, P.; DE RIJK, T.C.; STOLKER, A.A.M.; MULDER, P.P.J. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9450–9459, 2008.
- [65] AGUILERA, M.M. L.; VIDAL, J.L. M.; GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, p. 10–16, 2008.
- [66] BLASCO, C., TORRES, C.M.; PICÓ, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. **TrAC Trends Analytical Chemistry**, v. 26, 895–913, 2007.
- [67] LANÇAS, F. M. **Extracao em Fase Solida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 93 p.
- [68] HUCK, C.W.; BONN, G.K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 51–72, 2000.
- [69] 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. **Quimica. Nova**, v. 24, p. 68–76, 2001.
- [70] ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid phase extraction technique – Trends, opportunities and applications. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, p. 677–690, 2006.
- [71] GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. **Talanta**, v.79, p. 109–128, 2009.
- [72] VALENZUELA, A.I.; LORENZINI, R.; REDONDO, M.J.; FONT, G. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. **Journal of Chromatography A**, v. 839, p. 101–107, 1999.
- [73] ZOU, Q.-H LIU, Y.; XIE, M.-X.; HAN, J.; ZHANG, L. A rapid method for determination and confirmation of the thyreostats in milk and urine by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p. 184–191, 2005.
- [74] KUBAL-DRINCIC, H.; BAZULIC, D.; SAPUNAR-POSTRUZNIK, J.; GRUBELIC, M.; STUHE, G. Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic determination of chloramphenicol in muscle tissue. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 51, p. 871 – 875, 2003
- [75] CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; FERNANDEZ, F.; RODIL, R.; CELA, R. Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion—gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 93–98, 2005.

[76] KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

[77] ABAD, F. C.; WINCK, P.; SILVA, J. M.; CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A. Multiresidue determination of pesticides in carrots using Pressurized Liquid Extraction and gas chromatography with mass spectrometry detector. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21, p. 461-468, 2010.

[78] BERRADA, H.; BORRULL, F.; FONT, G. MARCÉ, R. M. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1208, p. 83-89, 2008.

[79] CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**. v. 1089, p. 1-17, 2005.

[80] JIMÉNEZ, V.; RUBIES, A.; CENTRICH, F.; COMPANYÓ, R.; GUITERAS, J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 1443–1451, 2011.

[81] WEN, Y.; WANG, Y.; FENG, Y. -Q. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**. v. 70, p.153–159, 2006.

[82] RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1221, p.84– 98, 2012.

[83] 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.

[84] LANÇAS, F. M. A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatografica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

[85] LANÇAS, F. M, Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatografica**. v. 3, p. 17-44, 2008.

[86] NETO, Alvaro J. S. **Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada**. 2007. 211f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2007.

[87] HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UVdetectors. **Food Chemistry**, v.114, p. 1141-1146, 2009.

- [88] SHEN, H., –Y.; JIANG, H., –L. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC–UVD, GC–ECD, GC–MS–EI–SIM and GCMS–NCI–SIM methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, p. 33-41, 2005.
- [89] SHALABY, A.R.; SALAMA, N. A; ABOU-RAYA, S. H.; EMAM, W. H.; MEHAYA, F. M. Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1660-1666, 2011.
- [90] LIU, B.; YAN, H.; QIAO, F.; GENG, Y. Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC–UV detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 90-94, 2011.
- [91] EVAGGELOPOULOU, E. N.; SAMANIDOU, V. F. Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1322-1329, 2013.
- [92] CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. PRINCIPAIS técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.
- [93] COMMISSION DECISION (EC) 657/2002 of 17 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Union**, p. 8-36, 2002
- [94] MORAES, M.C.B., LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química. Nova**, v. 26, p. 556-563, 2003.
- [95] HORIE, M.; TAKEGAMI, H.; TOYA, K.; NAKAZAWA, H. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, p 187-197, 2003.
- [96] ZELENY, R.; HARBECK, S.; SCHIMMEL, H. Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of 5-nitroimidazole drugs and their corresponding hydroxy metabolites in lyophilised pork meat . **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 249-256, 2009.
- [97] LI, H.; SMITH, M. L.; CHIESA, O. A.; KIJAK, P. J. Determination of sulfadimethoxine and 4N-acetylsulfadimethoxine in bovine plasma, urine, oral fluid, and kidney and liver biopsy samples obtained surgically from standing animals by LC/MS/MS. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 3, p. 237-246, 2009.
- [98] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 62 p.

[99] COMMISSION DECISION (EC) 657/2002 of 17 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Union**, p. 8-36, 2002.

[100] DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC–ESI–MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 93, 2010.

[101] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do plano nacional de resíduos e contaminantes - PNCRC ANIMAL**, Brasília, 2009.

[102] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução - RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.

[103] CODEX ALIMENTARIUS. **International Food Standards, Guidelines For The Validation Of Food Safety Control Measures Cac/GI 69**. London, 2008. p 1-16.

[104] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. Rockville: 2001. 22 p.

[105] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING; **Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for codex purposes, CX/MAS 95/3**, London, 1995. p. 1.

[106] 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 Chromatography A**, v. 987, p. 57, 2003.

[107] SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos para sabermos o que seremos."

Paulo Coelho

Capítulo 1

***Desenvolvimento e Validação de Metodologia
Analítica para a Determinação de Sulfonamidas
em Músculo Bovino e Frango empregando LC-
MS/MS***

1

Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Sulfonamidas em Músculo Bovino e Frango empregando LC-MS/MS

1. INTRODUÇÃO

Devido às exigências dos órgãos controladores, a grande maioria das amostras testadas atualmente tem apresentado resíduos de antibióticos dentro dos níveis considerados seguros segundo as normas internacionais; sendo assim, os métodos de triagem são cada vez mais usados para identificação rápida de uma grande quantidade de amostras permitindo, desta forma, que os programas de controle atuem de maneira mais eficiente. [1]

Como discutido na seção geral, o preparo de amostra é um processo de extração de um determinado resíduo químico em uma amostra e que, subsequentemente, envolve a purificação do extrato para isolar o analito de interesse e remover o máximo de interferentes da matriz que poderão afetar a detecção. Varias metodologias analíticas de preparo de amostras para análises de medicamentos veterinários estão disponíveis, porém, a cromatografia líquida (LC) é a técnica analítica mais empregada na atualidade. [2-10]

Assim como para muitos antibióticos, a extração seletiva de sulfonamidas de tecidos biológicos é complicada devido ao caráter polar dos analitos e dos componentes da matriz, os quais podem interferir seriamente durante as análises. Sendo assim, é necessário utilizar detectores seletivos e quase sempre mais caros como, por exemplo, a espectrometria de massas (MS). Caso contrário, uma boa limpeza da amostra deverá ser feita. Mesmo com o avanço das técnicas de separação e detecção, o preparo de amostra é fundamental para o processo de detecção analítica e um preparo de amostra eficiente é essencial para atingir os limites requeridos. [11, 12]

Numa recente revisão sobre métodos para determinação de sulfonamidas em matrizes biológicas, Wang e colaboradores, concluem que os métodos analíticos envolvem várias etapas de extração e limpeza, o que os torna demorados, dificultando, por exemplo, seu emprego como métodos de triagem. [1] Assim, nos últimos anos, vem ocorrendo várias tentativas em busca do desenvolvimento de novos métodos analíticos que visam à determinação de multirresíduos em alimentos de forma rápida, simples, segura, robusta, e

outras qualidades requeridas a um método ideal, ou seja, que atenda e siga os objetivos daqueles que o buscam.

Muitos trabalhos publicados de métodos multi-resíduos para sulfonamidas e/ou trimetoprim, relatam métodos adequados para a confirmação e quantificação desses antimicrobianos em leite, ovos, carne, alimento infantil. [1, 13-20]

1.1 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)

Com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes, Anastassiades e colaboradores, introduziram em 2003, um novo procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). O QuEChERS baseia-se em um trabalho realizado pelo Ministério da Agricultura dos Estados Unidos que buscou uma maneira simples, eficaz e barata de extrair e purificar resíduos de pesticidas em amostras de uma variedade de matrizes que faziam parte de sua rotina.[8]

O QuEChERS foi desenvolvido para a análise de resíduos de pesticidas em produtos com baixo teor de gordura. Seu principal objetivo era superar limitações práticas dos métodos de extração de multirresíduos de pesticidas disponíveis na época. Esse método, como o próprio nome indica, tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. [8]

Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas. O QuEChERS utiliza menor número de etapas ao se comparar com outros métodos multirresíduos, conduzindo a um custo relativamente baixo por amostra, o qual envolve uma extração inicial com acetonitrila seguida por uma etapa de extração/partição após a adição de uma mistura de sal, e clean-up por Extração em Fase Solida Dispersiva (do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE). [8,10, 21]

1.1.2 Etapas do QuEChERS

Para se realizar uma análise confiável e de qualidade, deve-se otimizar cada etapa, incluindo a quantidade de amostra, as condições de extração, partição e limpeza, além das condições cromatográficas. Cada etapa do processo analítico pode ser afetada por diferentes fatores.

Durante o desenvolvimento do método QuEChERS, Anastassiades e colaboradores, avaliaram os seguintes parâmetros: quantidade da amostra, natureza do solvente extrator, propriedades da amostra (ex. pH, quantidade de água, lipídeos e açúcares), forma de agitação, efeito da adição de sais para promover a partição líquido-líquido e facilitar a separação de fases, temperatura de extração, tipos de sorbentes usados na extração em fase sólida dispersiva, proporção amostra/solvente, procedimento de extração (ex. misturadores, agitadores), tempo de extração e número de repetições. [8]

De forma resumida, o procedimento de preparo otimizado para o método QuEChERS conforme abordado por Anastassiades e colaboradores, é descrito na Figura 1.1, e envolve as seguintes etapas: pesagem de 10 g de amostra; extração dos analitos com acetonitrila (10 mL); adição de 4g de MgSO_4 anidro e 1g de NaCl para etapa de partição/extração; adição de padrão interno (ISTD); obtenção de alíquota e clean-up com 150mg MgSO_4 e 25mg de PSA; obtenção de alíquota e análise GC/MS e/ou LC/MS. [8]

A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos. [10, 22, 23]

Para garantir de maneira simples uma maior eficiência do procedimento de preparo de amostra, usualmente é utilizada a menor quantidade possível de amostra, desde que esta garanta representatividade.

Figura 1.1 - Procedimento típico de extração QuEChERS

Fonte: QuEChERS. **Theory**. 2011. Disponível em: www.quechers.com. Acesso em: 6 jun. 2012.

Embora o emprego do método multiresíduo QuEChERS, para análises de pesticidas em alimentos não seja mais novidade, o mesmo têm despertado interesse por parte da comunidade científica para determinação de novos analitos. A primeira modificação do método foi feita por Lehotay e colaboradores, com a adição de uma etapa de tamponamento, cujo objetivo era de melhorar os percentuais de recuperação. Outras modificações de grande relevância como, a adição de C18, juntamente com PSA na etapa de clean-up (D-SPE) para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, principalmente aquelas que contêm gordura; mudança na solução de extração, entre outras tem sido reportada, todas com o objetivo de adequar a metodologia para análises de diferentes substâncias nas mais diversas matrizes. [21, 24-26, 32-34]

Alguns trabalhos recentes tem verificado a eficiência da metodologia QuEChERS para determinação de aflatoxinas em macarrão, sulfonamidas em ração animal, micotoxinas em ovos, medicamentos veterinários em alimentos para bebê, leite , etc. [35-39] Notavelmente, embora esta técnica seja muito atraente, tem sido pouco utilizado para a extração de medicamentos veterinários em tecido animal. [29, 40-43]

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica, baseada na abordagem QuEChERS, que possibilite a qualificação e quantificação de antibióticos da classe das sulfonamidas em músculo (frango e bovino), empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). A validação da metodológica envolveu a obtenção do erro analítico através das médias, desvios, CVs, linearidade, recuperação, exatidão, precisão e robustez de acordo com os critérios descritos da *Decisão 657* da comunidade européia. [35]

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Os padrões analíticos de sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametazina, sulfamerazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol, sulfaclorpiridazina, sulfaquinoxalina, sulfametizol, sulfatiazol foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Alemanha). Sulfato de magnésio (J.T. Baker, Mexico), acetato de sódio (J.T. Baker, México), octadecil silica (Alltech), PSA (Amina Primária Secundária, Supelco), ácido fórmico (Mallinckrodt, Xalostoc, México), acetonitrila (Tedia, Fairfield, EUA), metanol (Tedia, Fairfield, EUA), acetonitrila (J.T. Baker), metanol (J.T. Baker), água deionizada Milli-Q (Millipore-Bedford, EUA), foram também utilizadas.

As soluções estoque (500 mg L^{-1}) dos medicamentos veterinários foram preparadas em ACN:MeOH (50:50) e armazenadas a -18°C . A solução contendo a mistura dos compostos (Solução Mix) foi obtida diluindo-se a solução estoque em ACN:MeOH (50:50) para uma concentração final de 5 mg L^{-1} de cada componente. Estas soluções foram armazenadas em freezer por um período de até um mês. As matrizes (músculo de frango e bovino branco) utilizadas no estudo foram obtidas por doação.

3.2 Otimização do Método Cromatográfico e MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Os estudos foram desenvolvidos num sistema ACQUITY UPLC - Xevo TQ MS LC/MS/MS, consistindo de auto injetor modelo Sample Manager; Bomba de UPLC, modelo Binary Solvent Manager; Forno cromatográfico, High-Temp Column Heater, todos da Waters; coluna analítica Kinetex ($100 \times 2,1 \text{ mm} \times 2,6 \mu\text{m}$).

A otimização do método MRM foi feita por meio de infusão combinada (Figura 1.2). A infusão combinada é realizada combinando na entrada do capilar o analito com a fase móvel que será empregada na separação cromatográfica, de forma que os analitos entram na fonte de ionização nas condições mais próximas possíveis daquelas que serão usadas na análise. Foram otimizadas a voltagem do capilar e do cone, energia de colisão, temperatura de desolvatação. Após o desenvolvimento do método MRM, deu-se inicio a otimização da separação cromatográfica e, por fim, o dwell time.

Figura 1.2 - Representação do desenvolvimento automatizado método MS/MS (XEVO TQ MS by Waters Corporation).

A separação cromatográfica foi realizada em modo gradiente, empregando um fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ utilizando ACN e H_2O 0,1 % de ácido fórmico como fase móvel. A temperatura do forno foi mantida a 40°C . Foram monitoradas 20 transições (m/z), sendo um íon de quantificação e um segundo de confirmação, para cada uma das 10 sulfonamidas. O sistema ACQUITY UPLC - Xevo TQ MS LC/MS/MS foi operado no modo positivo (ES+), nas seguintes condições: tensão no capilar 3,50 kV; voltagem no cone 20 kV; temperatura da Fonte 150°C ; temperatura de desolvatação 400°C ; fluxo do gás de desolvatação 700L/hr, fluxo do gás de colisão 0,15 mL/min.

3.3 Otimização do Método de Preparo da Amostra

O procedimento de preparo de amostra seguiu a abordagem QuEChERS, desenvolvido para matrizes gordurosas, e descrito em 2005, por Lehotay e Mastovska [21].

Lehotay e Mastovska, desenvolveram um método “QuEChERS” com uma etapa inicial de extração de 15g de amostra, 15mL de ácido acético 1% em ACN (v/v) e adição 6 g

de MgSO₄ e 1,5 g de acetato de sódio, seguidos de uma etapa de *clean-up*, por dispersão em fase sólida (DSPE), com 50 mg de PSA, 50 mg de C18 e 150 mg de MgSO₄.

Vários estudos de recuperação foram feitos partindo-se do método descrito acima, porém como a intenção inicial era a diminuição no volume de solvente, fez-se necessário empregar menores quantidades de amostra. Assim, primeiramente efetuou-se um estudo empregando a metodologia descrita por Lehotay e Mastovska; no entanto a quantidade de amostra foi 1/3 daquela usada, ou seja, 5 g de amostra. Por consequência, todos os demais reagentes foram proporcionalmente diminuídos.

Diferentes métodos foram estudados durante a otimização da metodologia de extração, mas apenas os mais relevantes serão descritos nesta parte do trabalho. Para o desenvolvimento do método, cada experimento consistiu de um branco (matriz sem fortificação), duas amostras fortificadas no LMR e duas amostras fortificadas após a extração (extrato fortificado). O *Método A*, descrito a seguir, exemplifica as metodologias de extração estudadas.

Método A: 5,0 g da amostra processada (músculo) foram fortificadas com os compostos de interesse no LMR (100 µg/kg), homogeneizadas e deixadas por aproximadamente 15 min em geladeira para que houvesse maior interação dos analitos com a matriz. A seguir, adiciona-se 5 mL ACN 1% ácido acético, 2 g de MgSO₄ e 0,5 g de acetato de sódio. A amostra foi então imediatamente agitada (1 min em vortex) e centrifugada (5000 rpm por 5 min). Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi submetido a etapa de *clean-up*, por DSPE, com 50 mg de PSA, 50 mg de C18 e 150 mg de MgSO₄. O extrato foi agitado (30 seg em vortex) e centrifugado (5000 rpm por 2 min). Por fim, 700 µL do extrato sobrenadante foram secos em fluxo de nitrogênio. A amostra seca foi reconstituída com 700 µL do solvente da fase móvel (H₂O/ ACN 0,1% ácido fórmico), filtrada em filtro de 0,45 µm e analisada por LC-MS/MS. A Tabela 1.1 descreve resumidamente o desenvolvimento da metodologia de extração.

Numa segunda etapa da otimização, após estudos dos resultados anteriores optou-se em trabalhar melhor a otimização partindo-se do *Método D*. Dessa maneira reduziu-se ainda mais a quantidade da amostra; o volume de solvente empregado foi o dobro da massa da amostra. As modificações são descritas na Tabela 1.2.

Tabela 1.1 - Metodologias de Extração estudadas.

Método	Amostra (g)	Extração			Clean-up		
		Solvente	MgSO ₄ (mg)	Acetato de Sódio (mg)	MgSO ₄ (mg)	PSA (mg)	C18 (mg)
A	5	5 mL ACN 1% ácido acético	2000	500	150	50	50
B	5	5 mL ACN 1% ácido fórmico	2000	500	150	50	50
C	5	5 mL ACN:MeOH 0,1% ácido tricloroacético (70:30)	2000	500	150	50	50
D	5	5 mL ACN:MeOH 0,1% ácido fórmico (70:30)	2000	500	150	50	50

Tabela 1.2 - Otimização das Metodologias de Extração

Método	Amostra (g)	Extração			Clean-up		
		Solvente	MgSO ₄ (mg)	Acetato de Sódio (mg)	MgSO ₄ (mg)	PSA (mg)	C18 (mg)
E	2	4 mL ACN:MeOH 0,1% ácido fórmico (70:30)	800	200	150	50	50
F	2	4 mL ACN:MeOH 0,1% ácido fórmico (70:30)	800	200	-	-	-
G	2	4 mL ACN:MeOH 0,1% ácido fórmico (70:30)	-	-	-	25	50
H	2	4 mL ACN:MeOH 0,1% ácido fórmico (70:30)	-	-	-	-	-

3.3.1 Extração para Análise por LC-MS/MS pós-otimização

Primeiramente, 2 g de amostra de músculo de frango foram pesados em tubo falcon. Foram então adicionados 4 mL de ácido fórmico 0,1% em ACN:MeOH (70:30 (v/v)). Agitou-se em vortex por 1 minuto. Após a extração, seguida de centrifugação (5 min a 10.000 rpm), todo sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 25mg de PSA e 50mg de C18, para o *clean-up*. Agitou-se por mais 30 segundos em vortex, seguida por centrifugação durante 5

min a 5000 rpm. Uma alíquota de 2,0 mL da amostra foi seca sob fluxo de nitrogênio e banho a 40°C. Após secagem total, a amostra foi reconstituída com 1 mL de solvente (Fase Móvel) e, posteriormente, filtrada em filtros de 0,45µm e analisadas por LC-MS/MS.

3.4 Validação da Metodologia

O método analítico foi validado segundo a Decisão 2002/657/EC [35]. Os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, recuperação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), robustez, seletividade/especificidade, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).

Para avaliação da linearidade do método, foram construídas curvas analíticas *matrix-matched* de cada composto estudado. Uma curva analítica *matrix-matched*, é aquela na qual a fortificação com os analitos é feita após o processo de extração e clean-up. A construção da curva analítica usando extrato da própria matriz garante a presença de todos os coextratos presentes na mesma, e que eventualmente possam interferir nas análises

As curvas foram construídas com seis pontos, 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 vezes o LMR, e cada ponto foi feito em sextuplicata. O ponto 0,25 vezes o LMR não é exigido pela decisão 657. Os coeficientes lineares e angulares foram calculados através da equação da reta obtida graficamente por meio da média das áreas dos cromatogramas em função da concentração empregadas nos seis níveis. Para avaliação da recuperação, as amostras foram fortificadas, em três níveis 0,5, 1,0; 1,5 vezes o LMR (n=18). A recuperação de cada composto foi calculada através das equações da reta obtidas da linearidade.

A repetibilidade do método foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) da recuperação. Para tal, foram feitas seis fortificações para cada um dos três níveis 0,5, 1,0; 1,5 vezes o LMR (n=18). A repetibilidade foi realizada mais duas vezes sob as mesmas condições.

A reprodutibilidade intralaboratorial, assim como a repetibilidade, foram verificadas em três níveis de fortificação (0,5, 1,0; 1,5 vezes o LMR) em sextuplicata. O estudo de reprodutibilidade foi verificada em três condições distintas, sendo que a primeira foi realizada nas mesmas condições do estudo de recuperação; na segunda foi trocada a marca dos solventes de extração (ACN e MeOH) e a terceira foi executada por um segundo analista. A reprodutibilidade do método foi avaliada através do desvio padrão da recuperação.

A robustez do método foi realizada utilizando a abordagem de Youden, recomendada pela 657. A abordagem de Youden é de concepção fracionária. Neste teste, introduzem-se

pequenas alterações nas condições experimentais do método. A idéia não é uma alteração de cada vez, mas sim a introdução de diferentes variações, ao mesmo tempo. São escolhidas sete variáveis susceptíveis de influenciarem os resultados quando seus valores são ligeiramente alterados. A cada um dos sete fatores escolhidos foi atribuída uma letra de A a G. Os fatores escolhidos para alteração foram: (A) Tempo de agitação no processo de extração, (B) Tempo de agitação no processo de clean-up, (C) Quantidade de C18, (D) Quantidade de PSA, (E) Tempo de repouso após fortificação, (F) Volume de solvente de extração e (G) pH do solvente de extração.

Na Tabela 1.3, são apresentadas as alterações realizadas para cada fator, sendo atribuída a letra minúscula correspondente, para o valor variado. As alterações foram introduzidas em oito combinações diferentes, segundo a matriz descrita pelo teste de Youden. As combinações são apresentadas na Tabela 1.4.

Tabela 1.3 - Fatores avaliados na robustez do método

Parâmetros	Condição Nominal		Variação	
Tempo de agitação no processo de extração	60 segundos	A	50 segundos	a
Tempo de agitação no processo de clean-up	30 segundos	B	25 segundos	b
Quantidade de C18	100 mg	C	90 mg	c
Quantidade de PSA	50 mg	D	40 mg	d
Tempo de repouso após fortificação	15	E	20	e
Volume de solvente de extração	5 mL	F	4,95	f
pH do solvente de extração	3	G	2,9	g

Tabela 1.4 - Matriz de Youden.

Fator	Combinação Fatorial							
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	S	T	U	V	W	X	Y	Z

O efeito matriz pode causar um aumento ou a diminuição da resposta do detector para um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico. O estudo de efeito matriz é imprescindível quando se deseja trabalhar com uma curva de calibração do analito em solvente, ou seja, com uma curva de calibração não matrizada.

Os problemas com efeito de matriz não se limitam a métodos bioanalíticos baseados em HPLC-MS. Eles podem também estar em todos os outros métodos mais convencionais baseados, por exemplo, em HPLC-UV e HPLC-FLU. No entanto, ao contrário dos métodos convencionais, os procedimentos de preparo de amostra para ensaios de HPLC-MS/MS são normalmente mais simplificados e, muitas vezes, não há preocupação com a separação cromatográfica devido à aparente seletividade da detecção por MS/MS. Muitas vezes não se utiliza nem *clean up*. Diante disto, o problema de efeito de matriz tornou-se mais evidente e mais preocupante nos métodos HPLC-MS/MS, em comparação com os métodos convencionais.

Portanto, realizou-se a avaliação do efeito de matriz por comparação da resposta do detector (áreas medidas) das soluções padrão das sulfonamidas em solvente, com aquelas preparadas com o extrato branco do músculo de frango e bovino, em três níveis de concentração (50, 100, 150 µg/kg). O efeito de matriz foi calculado usando a equação 1.1.

Equação 1.1:

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = (B/A)100$$

Onde: A é a área do pico obtida para o analito em solvente, e B é a área do pico obtida para o analito em extrato fortificado pós-extração.

Para avaliação da Robustez, as amostras foram fortificadas no LMR e o estudo foi realizado em triplicata.

Os cálculos para a Robustez segundo abordagem de Youden, com pequenas alterações, devem ser feitas comparando as médias das letras maiúsculas (A_A a A_G) com as médias das minúsculas correspondentes (A_a a A_g), conforme a Equação 1.2.

Equação 1.2 - Equação empregada nos cálculos de robutez.

	Diferenças (D_i)	Quadrados das diferenças (D_i^2)
$A_A = \Sigma(A_i)/4$	$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$	$D_a^2 = \text{valor a}$
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$	$D_b^2 = \text{valor b}$
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$	$D_c^2 = \text{valor c}$
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$	$D_d^2 = \text{valor d}$
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$	$D_e^2 = \text{valor e}$
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$	$D_f^2 = \text{valor f}$
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$	$D_g^2 = \text{valor g}$
$A_a = \Sigma(a_i)/4$		
$A_b = \Sigma(b_i)/4$		
$A_c = \Sigma(c_i)/4$		
$A_d = \Sigma(d_i)/4$		
$A_e = \Sigma(e_i)/4$		
$A_f = \Sigma(f_i)/4$		
$A_g = \Sigma(g_i)/4$		

Desvio padrão das diferenças D_i (S_{Di})

$$S_{Di} = \sqrt{2 \times \Sigma \left(\frac{D_i^2}{7} \right)}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método LC-MS/MS

Durante a otimização do método cromatográfico buscou-se desenvolver uma corrida com um tempo relativamente curto a fim de reduzir o tempo de análise cromatográfica. Na Tabela 1.5 e Figura 1.3 é apresentado, respectivamente, o gradiente de eluição e o cromatograma do íon total (TIC) para as dez sulfonamidas (SAs).

Tabela 1.5 - Gradiente de eluição utilizado

Tempo (min)	Fluxo (ml min ⁻¹)	% A	% B
Initial	0.300	95.0	5.0
4.00	0.300	70.0	30.0
5.50	0.300	30.0	70.0
5.51	0.300	95.0	5.0
7.00	0.300	95.0	5.0
7.00	Stop		

Figura 1.3 - Cromatograma do íon total obtido no modo MRM para uma amostra de músculo de frango fortificado com sulfonamidas no LMR (100 µg kg⁻¹).

As sulfonamidas mostram um padrão de fragmentação bem típico, que inclui os íons de quantificação com m/z 156, 92 e 186, como mostrado nos cromatogramas das matrizes frango e bovino (Figuras 1.4 e 1.5). O íon m/z 156 mostrou ser mais intenso para a maioria das sulfonamidas, sendo, portanto nesses casos escolhido como íon de quantificação. As energias de colisão foram otimizadas individualmente para cada composto, ficando na faixa de 10-32 eV (Tabela 1.6).

Tabela 1.6 - Parâmetros de quantificação e confirmação no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) - LC-MS/MS

<i>Compostos</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MRM (m/z)</i>			<i>Dwell (sec)</i>	<i>Volt Cone</i>	<i>Energia de colisão</i>
Sulfacetamida*	1,98	214.97	->	108.17	0.040	10.0	20.0
Sulfacetamida		214.97	->	156.02	0.040	10.0	10.0
Sulfadiazina*	2,26	250.97	->	92.17	0.020	18.0	28.0
sulfadiazina		250.97	->	156.07	0.020	18.0	16.0
Sulfametoxazol*	4,09	253.97	->	92.24	0.015	16.0	28.0
Sulfametoxazol		253.97	->	156.08	0.015	16.0	16.0
Sulfatiazol*	2,48	255.90	->	92.18	0.030	18.0	28.0
Sulfatiazol		255.90	->	156.04	0.030	18.0	14.0
Sulfamerazina*	2,71	264.97	->	92.17	0.020	22.0	28.0
Sulfamerazina		264.97	->	172.08	0.020	22.0	16.0
Sulfametizol*	3,17	270.97	->	92.18	0.040	16.0	26.0
Sulfametizol		270.97	->	156.03	0.040	16.0	14.0
Sulfametazina*	3,12	278.97	->	92.18	0.030	22.0	30.0
sulfametazina		278.97	->	186.07	0.030	22.0	18.0
Sulfaclorpiridazina*	3,76	286.90	->	92.18	0.030	20.0	26.0
Sulfaclorpiridazina		286.90	->	156.03	0.030	20.0	16.0
Sulfaquinoxalina*	5,05	300.97	->	92.17	0.030	22.0	32.0
Sulfaquinoxalina		300.97	->	108.16	0.030	22.0	26.0
Sulfadimetoxina*	4,97	310.97	->	92.17	0.030	26.0	30.0
Sulfadimetoxina		310.97	->	156.07	0.030	26.0	22.0

**Transições de quantificação*

Figura 1.4 - Cromatogramas das transições estudadas obtidas no modo MRM para amostra de músculo de frango fortificada com 10 sulfonamidas no LMR (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Figura 1.5 - Cromatogramas das transições estudadas obtidas no modo MRM para amostra de músculo bovino fortificada com 10 sulfonamidas no LMR (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

4.2 Otimização do método de Extração

Desenvolvida a separação cromatográfica e o método MRM, prosseguiu-se com a otimização da metodologia de extração. Conforme mostra a Figura 1.6, os *Métodos A e B* apresentaram recuperações abaixo de 60%; analisando-se as recuperações para cada analito individualmente, observa-se uma semelhança nas recuperações para ambos os métodos. A recuperação para a Sulfacetamida, por exemplo, foi respectivamente de 51,6 e 52,8 para o *método A e B*.

O valor do pH pode alterar a forma dos analitos e afetar grandemente a eficiência da extração. De modo geral a interação do analito com a matriz pode ser evitada realizando a extração em baixos pHs. Uma possível explicação para isto poderia ser que em condições neutras, analitos ácidos estão em seu estado desprotonado e podem interagir com os grupos funcionais amino (protonados) presentes na matriz, assim como analitos básicos podem interagir com grupos funcionais ácidos (desprotonados) pertencentes à matriz. [36, 37]

Em valores de baixo pH os grupos ácidos protonados estão no estado neutro, enquanto grupos básicos estão em seu estado neutro ou protonado, de modo que menor ou nenhuma interação ocorre com a matriz e os analitos permanecem dissolvidos no solvente [36,37].

Dentre as quatro primeiras metodologias de extração investigadas (ACN 1% ácido acético, ACN 1% ácido fórmico, ACN:MeOH (70:30) 0,1% ácido tricloroacético, ACN:MeOH (70:30) 0,1% ácido fórmico), a que mostrou recuperações mais adequadas para a maior parte dos analitos incluídos no teste foi ACN:MeOH (70:30) 0,1% ácido fórmico (*Método D*). As recuperações ficaram na faixa de 51,4-92,5 %, sendo que o sulfametazol apresentou a menor recuperação e a sulfadimetoxina a maior. Todos os demais analitos apresentaram recuperação superior a 63 %. Portanto, foi decidido continuar as investigações com o *Método D*.

Um dos fatores que poderia melhorar as recuperações seria empregar um volume maior de solvente, em relação à massa da amostra. Assim, ao invés de trabalhar na faixa de 1:1 (massa da amostra:solvente), após estudos decidiu-se trabalhar na faixa 1:2 (massa da amostra:solvente). No entanto, o principal inconveniente seria fazer o uso de uma quantidade maior de solvente. Para contornar esse problema optou-se por empregar quantidade menor de amostras, trabalhando numa razão 1:2, de modo que não houvesse necessidade de fazer uso de volumes maiores de solvente. Além da diminuição na quantidade de amostra, foram feitas alterações no processo de extração como descrito anteriormente. (Tabela 1.2).

Figura 1.6 - Recuperações (%) de sulfonamidas em diferentes solventes (tecido bovino).

Vários trabalhos têm descrito extrações de sulfonamidas em diferentes matrizes, sendo muitas delas realizadas apenas com acetonitrila e um ácido orgânico (acético, fórmico, trifluoracético), seguido de diferentes processos de limpeza ou até mesmo sem esta etapa [37-43].

O aumento da proporção do volume do solvente acetonitrila/metanol em relação ao volume de amostra, de 1:1 para 1:2 (v/v) (amostra:acetonitrila/metanol), aumentou o rendimento de extração. Como observado na Figura 1.7, a modificação no volume do solvente proporcionou rendimentos superiores a 70% para 7 das SAs estudadas; a única discrepância observada foi quanto a recuperação para a sulfaquinoxalina, pois todas as demais sulfas apresentaram melhoras na recuperação.

Pode-se notar, também, o efeito negativo da adição de sal, pois a média do rendimento da extração caiu 24,6%. Com o aumento da força iônica da solução aquosa pela adição de sais esperava-se um efeito positivo devido à solvatação dos íons pelas moléculas de água, facilitando a migração dos analitos para a fase orgânica. Os resultados, no entanto, indicam que a adição de sais diminui a porcentagem de extração dos compostos. O efeito do clean-up sobre as recuperações é evidenciado pelo aumento nas recuperações, as quais ficaram acima de 110% para sulfametoxazol, sulfaclopiridazina e sulfaquinoxalina. Assim o método que se apresentou mais adequado para a validação foi o *Método G*, cujos valores de recuperações estão dentro dos critérios requeridos.

Figura 1.7 - Recuperações (%) de sulfonamidas em tecido bovino em diferentes condições de extração e clean-up.

4.3 Resultados da Validação

A aplicabilidade do método de extração desenvolvido foi testada seguindo os critérios de aceites para validação do método analítico, tal como indicado na Decisão 2002/657/CE. A mesma metodologia foi seguida para as duas matrizes (músculo de frango e bovino). As figuras de mérito obtidas são discutidas a seguir para cada parâmetro da validação.

4.3.1 Linearidade

As curvas analíticas *matrix matched* foram construídas nas concentrações igual a 0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ou seja ao redor do LMR dos compostos estudados. Na Tabela 1.7 são apresentadas a equação da reta e o coeficiente de correlação (r^2) para as SAs. Nota-se que o coeficiente de determinação (r^2) apresentou valor acima de 0,98, atendendo recomendações de órgãos como ANVISA e FDA indicando, assim, linearidade na faixa trabalhada [44-47].

Tabela 1.7 - Linearidade para detecção de 10 sulfonamidas em músculo de frango e bovino.

Compostos	Matriz	Linearidade		
		Faixa (µg/kg)	Equação	R ²
Sulfacetamida	Frango	0-200	$y = 131,12x - 504,09$	0,994
	Bovino	0-200	$y = 124,6x - 458,1$	0,995
Sulfadiazina	Frango	0-200	$y = 240,9x - 1121,$	0,992
	Bovino	0-200	$y = 205,195x - 963,138$	0,990
Sulfametazina	Frango	0-200	$y = 398,7x - 3048,$	0,986
	Bovino	0-200	$y = 203,628x - 462,007$	0,996
Sulfamerazina	Frango	0-200	$y = 241,7x - 1870,0$	0,983
	Bovino	0-200	$y = 160,8x - 167,5$	0,991
Sulfaclopiridazina	Frango	0-200	$y = 77,61x + 44,99$	0,996
	Bovino	0-200	$y = 56,00x - 109,33$	0,989
Sulfametizol	Frango	0-200	$y = 273,6x - 1173,$	0,993
	Bovino	0-200	$y = 274,24x - 69,38$	0,989
Sulfatiazol	Frango	0-200	$y = 388,4x - 3727,$	0,981
	Bovino	0-200	$y = 201,82x - 450,04$	0,988
Sulfametoxazol	Frango	0-200	$y = 233,041x - 769,785$	0,991
	Bovino	0-200	$y = 169,60x - 106,03$	0,989
Sulfadimetoxina	Frango	0-200	$y = 549,2x - 764,9$	0,997
	Bovino	0-200	$y = 396,94x - 1.241,49$	0,989
Sulfaquinoxalina	Frango	0-200	$y = 158,8x - 680,1$	0,995
	Bovino	0-200	$y = 169,28x - 782,267$	0,995

4.3.2 Recuperação

Os estudos de recuperação foram obtidos como recomendado pela Decisão 657, e as recuperações medias de cada analito são apresentadas na Tabela 1.8. A recuperação e o coeficiente de variação, calculados para as concentrações estabelecidas, estão dentro da faixa de 70 a 110% para recuperação, e CV máximo de 20% para esses parâmetros, respectivamente, conforme estabelecidos pela Decisão 657. Portanto os ensaios de recuperações se mostraram eficientes. Os valores de recuperação encontrados pelo método validado foram superiores ou equivalentes aos definidos por outros estudos.

Tabela 1.8 - Recuperação

<i>Compostos</i>	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	<i>Matriz</i>	Recuperação (%)	CV (%) n=6	Erro relativo (%)
<i>Sulfacetamida</i>	50	<i>Frango</i>	107,5	8,4	7,6
		<i>Bovino</i>	100,8	4,9	0,8
	100	<i>Frango</i>	91,4	5,6	8,6
		<i>Bovino</i>	102,9	4,6	2,9
	150	<i>Frango</i>	90,4	1,7	9,7
		<i>Bovino</i>	102,8	2,9	2,8
<i>Sulfadiazina</i>	50	<i>Frango</i>	95,9	12,0	4,0
		<i>Bovino</i>	88,2	3,4	11,8
	100	<i>Frango</i>	96,5	8,7	3,5
		<i>Bovino</i>	93,4	8,9	6,6
	150	<i>Frango</i>	92,1	4,9	7,9
		<i>Bovino</i>	96,0	8,2	4,0
<i>Sulfametazina</i>	50	<i>Frango</i>	93,3	7,1	6,6
		<i>Bovino</i>	98,9	3,4	1,0
	100	<i>Frango</i>	89,9	3,7	10,1
		<i>Bovino</i>	99,3	1,5	0,7
	150	<i>Frango</i>	92,3	11,2	7,7
		<i>Bovino</i>	98,8	2,2	1,1
<i>Sulfamerazina</i>	50	<i>Frango</i>	95,5	5,8	4,4
		<i>Bovino</i>	92,7	5,2	7,4
	100	<i>Frango</i>	89,3	5,0	10,7
		<i>Bovino</i>	96,6	5,6	3,4
	150	<i>Frango</i>	95,7	7,5	4,3
		<i>Bovino</i>	100,8	3,5	0,8
<i>Sulfaclorpiridazina</i>	50	<i>Frango</i>	92,3	13,2	7,6
		<i>Bovino</i>	93,1	13,0	7,0
	100	<i>Frango</i>	96,4	11,3	3,6
		<i>Bovino</i>	104,7	1,9	8,1
	150	<i>Frango</i>	95,5	6,0	4,5
		<i>Bovino</i>	98,7	7,5	1,4
<i>Sulfametizol</i>	50	<i>Frango</i>	96,7	10,5	3,2
		<i>Bovino</i>	100,4	9,9	0,4
	100	<i>Frango</i>	93,7	7,5	6,3
		<i>Bovino</i>	100,7	5,5	0,7
	150	<i>Frango</i>	96,0	5,8	3,9
		<i>Bovino</i>	102,3	2,5	2,3

Tabela 1.8 (Continuação)

<i>Compostos</i>	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	<i>Matriz</i>	Recuperação (%)	CV (%) n=6	Erro relativo (%)
<i>Sulfatiazol</i>	50	<i>Frango</i>	95,8	3,1	4,2
		<i>Bovino</i>	92,7	9,2	7,4
	100	<i>Frango</i>	87,3	3,3	12,7
		<i>Bovino</i>	92,9	3,9	7,1
	150	<i>Frango</i>	99,9	8,4	0,1
		<i>Bovino</i>	93,8	4,7	6,2
<i>Sulfametoxazol</i>	50	<i>Frango</i>	93,8	6,4	6,2
		<i>Bovino</i>	89,5	7,6	10,4
	100	<i>Frango</i>	90,0	6,7	10
		<i>Bovino</i>	95,7	4,8	4,2
	150	<i>Frango</i>	95,1	4,3	4,9
		<i>Bovino</i>	100,3	7,3	0,3
<i>Sulfadimetoxina</i>	50	<i>Frango</i>	87,8	6,6	12,2
		<i>Bovino</i>	95,0	6,2	5,0
	100	<i>Frango</i>	94,1	9,5	5,9
		<i>Bovino</i>	100,6	1,6	0,6
	150	<i>Frango</i>	96,3	2,3	3,7
		<i>Bovino</i>	97,4	7,3	2,6
<i>Sulfaquinoxalina</i>	50	<i>Frango</i>	97,0	4,7	3,0
		<i>Bovino</i>	102,8	2,7	2,8
	100	<i>Frango</i>	93,6	5,3	6,4
		<i>Frango</i>	98,6	1,7	1,4
	150	<i>Frango</i>	91,8	3,9	8,3
		<i>Bovino</i>	101,7	1,8	1,7

4.3.3 Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade)

A precisão do método foi determinada por meio de ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade do método analítico. O Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV) das concentrações determinadas para cada composto foram calculados e estão resumidos na Tabela 1.9 e 1.10 para a repetibilidade e reprodutibilidade, respectivamente. Pode-se observar que os desvios padrão relativos (CV) apresentaram-se inferiores a 20%, para todos os medicamentos veterinários; isso indica o bom desempenho do método desenvolvido.

Tabela 1.9 - Repetibilidade

Compostos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Repetibilidade (%)	DP (%)	CV (%) n=6
<i>Sulfacetamida</i>	50	<i>Frango</i>	95,5	8,6	9,0
		<i>Bovino</i>	97,5	4,1	4,2
	100	<i>Frango</i>	88,7	7,1	8,0
		<i>Bovino</i>	101,3	1,7	1,7
	150	<i>Frango</i>	89,5	2,3	2,6
		<i>Bovino</i>	102,0	2,0	2,0
<i>Sulfadiazina</i>	50	<i>Frango</i>	97,9	3,6	3,7
		<i>Bovino</i>	95,3	5,0	5,2
	100	<i>Frango</i>	94,2	4,9	5,2
		<i>Bovino</i>	95,2	2,0	2,0
	150	<i>Frango</i>	91,7	1,2	1,3
		<i>Bovino</i>	98,5	3,9	4,0
<i>Sulfametazina</i>	50	<i>Frango</i>	95,8	2,5	2,6
		<i>Bovino</i>	100,3	2,3	2,2
	100	<i>Frango</i>	87,1	2,7	3,1
		<i>Bovino</i>	99,0	1,2	1,2
	150	<i>Frango</i>	90,9	1,4	1,5
		<i>Bovino</i>	99,6	1,4	1,5
<i>Sulfamerazina</i>	50	<i>Frango</i>	94,8	2,4	2,5
		<i>Bovino</i>	94,4	3,0	3,2
	100	<i>Frango</i>	88,5	1,5	1,7
		<i>Bovino</i>	97,3	3,9	4,1
	150	<i>Frango</i>	94,2	2,4	2,6
		<i>Bovino</i>	100,3	2,1	2,1
<i>Sulfaclopiridazina</i>	50	<i>Frango</i>	88,9	3,8	4,2
		<i>Bovino</i>	94,0	2,8	3,0
	100	<i>Frango</i>	94,1	2,7	2,9
		<i>Bovino</i>	100,1	4,2	4,2
	150	<i>Frango</i>	96,7	2,6	2,7
		<i>Bovino</i>	101,2	2,2	2,2
<i>Sulfametizol</i>	50	<i>Frango</i>	98,1	1,6	1,6
		<i>Bovino</i>	95,7	4,6	4,8
	100	<i>Frango</i>	93,5	2,2	2,3
		<i>Bovino</i>	100,3	1,8	1,8
	150	<i>Frango</i>	96,1	2,9	3,0
		<i>Bovino</i>	102,5	2,5	2,4

Tabela 1.9 (Continuação)

Compostos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Repetibilidade (%)	DP (%)	CV (%) n=6
<i>Sulfatiazol</i>	50	<i>Frango</i>	95,6	1,6	1,6
		<i>Bovino</i>	92,2	0,7	0,7
	100	<i>Frango</i>	86,0	3,5	4,1
		<i>Bovino</i>	98,1	5,1	5,2
	150	<i>Frango</i>	96,2	3,8	4,0
		<i>Bovino</i>	95,4	1,6	1,7
<i>Sulfametoxazol</i>	50	<i>Frango</i>	93,9	0,7	0,8
		<i>Bovino</i>	96,3	4,9	5,1
	100	<i>Frango</i>	90,6	3,0	3,3
		<i>Bovino</i>	97,7	2,6	2,7
	150	<i>Frango</i>	91,6	4,0	4,4
		<i>Bovino</i>	100,8	1,0	1,0
<i>Sulfadimetoxina</i>	50	<i>Frango</i>	94,6	6,0	6,3
		<i>Bovino</i>	96,6	3,3	3,5
	100	<i>Frango</i>	95,3	1,0	1,1
		<i>Bovino</i>	97,9	3,0	3,1
	150	<i>Frango</i>	94,7	4,8	5,1
		<i>Bovino</i>	91,1	2,2	2,4
<i>Sulfaquinoxalina</i>	50	<i>Frango</i>	98,3	1,9	1,9
		<i>Bovino</i>	99,9	2,7	2,7
	100	<i>Frango</i>	93,3	1,4	1,5
		<i>Bovino</i>	97,2	3,5	3,7
	150	<i>Frango</i>	92,4	4,2	4,5
		<i>Bovino</i>	101,9	3,2	3,1

Tabela 1.10 - Reprodutibilidade

Compostos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Reprodutibilidade (%)	DP (%)	CV (%) n=6
<i>Sulfacetamida</i>	50	<i>Frango</i>	89,3	8,0	8,9
		<i>Bovino</i>	97,7	0,9	0,9
	100	<i>Frango</i>	92,8	5,1	5,5
		<i>Bovino</i>	99,8	3,3	3,3
	150	<i>Frango</i>	94,9	4,7	5,0
		<i>Bovino</i>	101,8	0,7	0,7
<i>Sulfadiazina</i>	50	<i>Frango</i>	95,4	9,9	10,4
		<i>Bovino</i>	95,5	6,4	6,7
	100	<i>Frango</i>	99,5	6,8	6,8
		<i>Bovino</i>	96,0	2,6	2,7
	150	<i>Frango</i>	102,3	3,2	3,1
		<i>Bovino</i>	97,8	1,2	1,2
<i>Sulfametazina</i>	50	<i>Frango</i>	95,6	7,5	7,9
		<i>Bovino</i>	97,2	2,5	2,5
	100	<i>Frango</i>	92,9	4,4	4,7
		<i>Bovino</i>	97,3	2,0	2,1
	150	<i>Frango</i>	104,6	11,3	10,8
		<i>Bovino</i>	95,3	1,9	2,0
<i>Sulfamerazina</i>	50	<i>Frango</i>	95,6	7,5	7,9
		<i>Bovino</i>	98,7	5,6	5,7
	100	<i>Frango</i>	92,9	4,4	4,7
		<i>Bovino</i>	101,0	3,8	3,8
	150	<i>Frango</i>	104,6	11,3	10,8
		<i>Bovino</i>	101,9	4,9	4,8
<i>Sulfaclopiridazina</i>	50	<i>Frango</i>	90,5	9,6	10,7
		<i>Bovino</i>	97,4	3,2	3,2
	100	<i>Frango</i>	99,5	4,2	4,2
		<i>Bovino</i>	98,3	0,5	0,5
	150	<i>Frango</i>	99,9	1,9	1,9
		<i>Bovino</i>	103,2	1,7	1,6
<i>Sulfametizol</i>	50	<i>Frango</i>	98,9	4,6	4,7
		<i>Bovino</i>	97,3	0,6	0,7
	100	<i>Frango</i>	98,9	2,3	2,3
		<i>Bovino</i>	98,3	2,0	2,0
	150	<i>Frango</i>	105,7	4,6	4,4
		<i>Bovino</i>	97,5	1,1	1,2

Tabela 1.10 (Continuação)

Compostos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matriz	Reprodutibilidade (%)	DP (%)	CV (%) n=6
<i>Sulfatiazol</i>	50	<i>Frango</i>	92,8	7,6	8,1
		<i>Bovino</i>	94,9	6,2	6,6
	100	<i>Frango</i>	87,2	2,0	2,3
		<i>Bovino</i>	100,6	2,4	2,4
	150	<i>Frango</i>	107,3	9,7	9,0
		<i>Bovino</i>	98,5	0,5	0,5
<i>Sulfametoxazol</i>	50	<i>Frango</i>	92,4	9,1	9,9
		<i>Bovino</i>	100,1	3,9	3,9
	100	<i>Frango</i>	92,6	2,6	2,8
		<i>Bovino</i>	99,0	3,3	3,4
	150	<i>Frango</i>	101,1	4,1	4,0
		<i>Bovino</i>	97,2	3,1	3,2
<i>Sulfadimetoxina</i>	50	<i>Frango</i>	91,8	7,4	8,1
		<i>Bovino</i>	92,6	7,4	8,0
	100	<i>Frango</i>	96,1	0,9	1,0
		<i>Bovino</i>	98,8	2,2	2,2
	150	<i>Frango</i>	100,9	4,9	4,8
		<i>Bovino</i>	97,7	1,1	1,1
<i>Sulfaquinoxalina</i>	50	<i>Frango</i>	91,6	2,0	2,2
		<i>Bovino</i>	97,8	2,7	2,7
	100	<i>Frango</i>	97,5	1,6	1,6
		<i>Bovino</i>	99,5	1,4	1,4
	150	<i>Frango</i>	103,2	7,3	7,1
		<i>Bovino</i>	101,8	2,2	2,2

4.3.4 Robustez

Segundo a abordagem de Youden, sempre que o desvio padrão, obtido da robustez, for significativamente maior que o desvio padrão do método realizado nas condições de reprodutibilidade intralaboratorial, pode-se deduzir que o conjunto de fatores escolhidos tem influência no resultado, mesmo que não haja influência significativa de cada fator isoladamente. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1.11, observa-se que o método para os antibióticos da classe das SAs se mostrou robusto frente às alterações estudadas. Os resultados mostraram ser consistente com os resultados dos experimentos de reprodutibilidade executada para cada matriz.

Tabela 1.11 - Robustez

Compostos	Desvio Padrão (%)		
	Matriz	Robustez	Reprodutibilidade Interlaboratorial
<i>Sulfacetamida</i>	<i>Frango</i>	5,2	5,1
	<i>Bovino</i>	3,1	3,3
<i>Sulfadiazina</i>	<i>Frango</i>	6,0	6,8
	<i>Bovino</i>	2,5	2,6
<i>Sulfametazina</i>	<i>Frango</i>	4,0	4,4
	<i>Bovino</i>	1,3	2,0
<i>Sulfamerazina</i>	<i>Frango</i>	3,4	4,4
	<i>Bovino</i>	3,5	3,8
<i>Sulfaclorpiridazina</i>	<i>Frango</i>	3,7	4,2
	<i>Bovino</i>	0,3	0,5
<i>Sulfametizol</i>	<i>Frango</i>	2,3	2,3
	<i>Bovino</i>	1,4	2,0
<i>Sulfatiazol</i>	<i>Frango</i>	2,0	2,0
	<i>Bovino</i>	2,3	2,4
<i>Sulfametoxazol</i>	<i>Frango</i>	2,7	2,6
	<i>Bovino</i>	2,7	3,3
<i>Sulfadimetoxina</i>	<i>Frango</i>	0,8	0,9
	<i>Bovino</i>	2,0	2,2
<i>Sulfaquinoxalina</i>	<i>Frango</i>	1,6	1,6
	<i>Bovino</i>	1,2	1,4

4.3.5 Seletividade/Especificidade

Análises de brancos de amostras não apresentaram picos na região de interesse, indicando boa especificidade do método, como mostrado nas Figuras 1.8 e 1.9 para as matrizes músculo de frango e bovino, respectivamente. A presença dos compostos pode ser facilmente distinguida com base nos tempos de retenção dos analitos em estudo, mostrado anteriormente nos cromatogramas das SAs por meio da Figura 1.4 para a matriz frango e Figura 1.5 para a matriz bovina.

Figura 1.8 - Cromatogramas para avaliação da especificidade para a matriz frango.

Figura 1.9 - Cromatogramas para avaliação da especificidade para a matriz bovina.

4.3.6 Estudo do Efeito de matriz

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação da resposta instrumental

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por comparação da resposta do detector (áreas medidas) das soluções padrão das sulfonamidas em solvente com aquelas preparadas com o extrato branco do músculo de frango e bovino, em três níveis de concentração (50, 100, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Quando a média das respostas das soluções preparadas na matriz estiver entre 80 a 120% das médias das respostas das soluções preparadas em solvente, este efeito não pode ser considerado significativo nos resultados analíticos quantitativos da amostra. Abaixo desses valores ocorre a supressão do sinal e acima a ampliação. Podemos observar pelas Figuras 1.10 e 1.11 que em ambas as amostras há efeito de matriz, havendo a supressão do sinal para todos analitos na matriz bovina.

Figura 1.10 – Efeito de matriz sobre a matriz músculo de frango.

Figura 1.11 – Efeito de matriz sobre a matriz músculo de bovino.

4.3.7 Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de detecção ($CC\beta$)

As recomendações da Decisão 2002/657/EC da União Europeia não contemplam o LOD nem o limite de quantificação (LOQ) na validação do método destinado para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. No entanto, estabelece a avaliação de outros dois parâmetros, o limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). A Tabela 1.12 traz os valores obtidos para o de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).

Tabela 1.12 - Limite de decisao ($CC\alpha$) e capacidade de deteccao ($CC\beta$).

Composto	Matriz	$CC\alpha$ ($\mu\text{g/kg}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g/kg}$)
<i>Sulfacetamida</i>	<i>Frango</i>	109,5	119,1
	<i>Bovino</i>	105,5	111,0
<i>Sulfadiazina</i>	<i>Frango</i>	111,2	122,3
	<i>Bovino</i>	104,4	108,8
<i>Sulfametazina</i>	<i>Frango</i>	105,0	110,0
	<i>Bovino</i>	103,4	106,9
<i>Sulfamerazina</i>	<i>Frango</i>	112,9	125,7
	<i>Bovino</i>	106,2	112,3
<i>Sulfaclorpiridazina</i>	<i>Frango</i>	107,0	113,9
	<i>Bovino</i>	100,9	101,8
<i>Sulfametizol</i>	<i>Frango</i>	106,2	112,4
	<i>Bovino</i>	103,3	106,6
<i>Sulfatiazol</i>	<i>Frango</i>	103,7	107,4
	<i>Bovino</i>	104,0	108,0
<i>Sulfametoxazol</i>	<i>Frango</i>	104,6	109,1
	<i>Bovino</i>	105,5	111,0
<i>Sulfadimetoxina</i>	<i>Frango</i>	113,2	126,5
	<i>Bovino</i>	103,6	107,2
<i>Sulfaquinoxalina</i>	<i>Frango</i>	102,7	105,4
	<i>Bovino</i>	102,3	104,6

4.3.8 Análise de Amostra Real

Após a validação da metodologia, o método foi empregado na análise de amostras de músculo bovino adquiridas em mercados locais. Foram analisadas amostras provenientes de 11 mercados diferentes. Os mercados serão identificados com letras de A-J. As análises foram feitas em duplicatas. Entre as 11 amostras analisadas, foram encontrados resíduos de sulfacetamida, sultiazol, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina. Todas as concentrações apresentaram-se abaixo do LMR não representando, em princípio, “riscos” à saúde do consumidor.

Os antibióticos que apresentaram resultado positivo para os resíduos avaliados foram considerados como identificados positivamente, pois todos os critérios de confirmação foram preenchidos: tempo de retenção idêntico ao da observada para o *matrix matched* e os íons de quantificações e confirmações característicos dos produtos. Na Figura 1.13 é mostrado o cromatograma de amostras obtidas em dois supermercados, dentre aqueles que apresentaram resíduos de sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina.

Tabela 1.13 - Cromatograma para amostra real de músculo bovino compradas de supermercados locais.

5 CONCLUSÃO

A aplicação do procedimento proposto, baseado no procedimento QuEChRES provou ser eficiente e bem sucedido na extração e SAs em músculo de frango e bovino. A avaliação dos parâmetros linearidade, recuperação, repetibilidade, reprodutibilidade, robustez, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de decisão ($CC\beta$), seletividade/especificidade, para as SAs são satisfatórios, e indica o bom desempenho do método analítico proposto de acordo com os objetivos estabelecidos para o presente estudo.

O procedimento de preparação da amostra é fácil e de simples operação, além de requerer baixo consumo de solventes.

Por fim, o método proposto com base na abordagem QuEChRES apresentou-se de baixo custo e ambientalmente amigável.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] 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 Contaminants**, v. 23, p. 362-384, 2006.
- [2] KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.
- [3] OBANA, H.; AKUTSU, K.; OKIHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; HORI, S., Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using a high capacity absorbent polymer for water. **Analyst**, v. 124, p. 1159-1165, 1999.
- [4] RICHTER, B. E.; HOEFLER, F.; LINKERHAEGER, M. Determining organophosphorus pesticides in foods using accelerated solvent extraction with large sample sizes. **LC-GC**, v. 19, p. 408-412, 2001.
- [5] ADOU, K.; BONTOLYAN, W. R.; SWEENEY, P. J. Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by Accelerated Solvent Extraction and Capillary Gas Chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4153-4160, 2001.
- [6] LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytica Bioanalytica Chemistry**, v. 389, p. 1663-1683, 2007.
- [7] LEHOTAY, S., Determination of pesticide residues in non fatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry: collaborative study. **Journal of AOAC**, v. 85, p. 1148, 2002.
- [8] ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC**, v. 86, p. 412-431, 2003.
- [9] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-53, 2007.
- [10] PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

- [11] STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.TH. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. **Journal of Chromatography A**, v.1067, p. 15-53, 2005.
- [12] 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.
- [13] BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; POLCI, M.L. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamide antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p. 4225, 2003
- [14] FANG, G.Z.; HE, J.X.; WANG, S. Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. **Journal Chromatography A**, v. 1127, p. 12, 2006.
- [15] GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; SERGI, M.; OLM, 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 Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 4614, 2004.
- [16] SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y. N.; HU, J. Y.; MENG, J. M.; TU, X. M.; XU, S. K. 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, 2005.
- [17] BAERE, S. D.; BAERT, K.; CROUBELS, S.; BUSSE, J. D.; WASCH, K. D.; BACKER, P. D. Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Analyst**, v. 125, p. 409, 2000.
- [18] SERGI, M.; GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S.; MATERAZZI, S.; CURINI, R. MSPD Extraction Sulfona from meat followed by LC tandem MS determination. **Chromatography**, v.65, p. 757-761, 2007.
- [19] 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, 2007.
- [20] SHERIDAN, R.; POLICASTRO, B.; THOMAS, S.; RICE, D. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 3509, 2008.
- [21] LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S.J. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 630-638, 2005.

- [22] MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 259, p. 1040, 2004.
- [23] LEHOTAY, S. J.; LIGHTFIELD, A. R.; HARMAN-FETCHO, J. A.; DONOGHUE, D. J. Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4589, 2001.
- [24] LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615-629, 2005.
- [25] LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, 2010.
- [26] LOPES, R. P.; AUGUSTI, D. V.; SOUZA, L. F.; SANTOS, F. A.; LIMA, J. A.; VARGAS, E. A. Development and validation (according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 3, p. 606-613, 2011.
- [27] LOMBARDO-AGÜÍ; M.; GÁMIZ-GRACIA; L.; CRUCES-BLANCO; C.; GARCÍA-CAMPAÑA; A. M. Comparison of different sample treatments for the analysis of quinolones in milk by capillary-liquid chromatography with laser induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4966-4971, 2011.
- [28] BLASCO, C.; MASIA, A.; MORILLAS, F.G.; PICÓ, Y. Procedures for Antibiotic Residues in Bovine Muscle Tissues. **Journal of AOAC International**, v. 94, p. 991-1003, 2011.
- [29] PULIDO, M. M.; LÓPEZ, B. G.; CARCÍA-REYES, J.F.; RAMOS, N. M.; DÍAZ, A. M. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 1419-1427, 2011.
- [30] FRENICH, A. G.; AGUILERA, M. M. L.; VIDAL, J.L. M.; GONZÁLEZ, R. R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, p. 150-160, 2010.
- [31] AGUILERA, M.M. L.; VIDAL, J.L. M.; GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, p. 10-16, 2008.
- [32] CUNHA, S. C.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, B. M. P. P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 620, 2007.

- [33] MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S. J.; WEGSCHEID, J. S.; SZPYLKA, K. A. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5959, 2010.
- [34] KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts, and doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5950, 2010.
- [35] COMMISSION DECISION (EC) 657/2002 of 17 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Union**, p. 8-36, 2002
- [36] DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 93, 2010.
- [37] MOL, H.G.J.; BOLANOS, P. P.; ZOMER, P.; DE RIJK, T.C.; STOLKER, A.A.M.; MULDER, P.P.J. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9450-9459, 2008.
- [38] LU, K.; CHUNG, Y.; CHEN; LEE, M. 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.
- [39] ZENGXUAN, C.; ZHANG, Y.; PAN, H.; TIE, X. O.; REN, Y. I. Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1200, p. 144-155, 2008.
- [40] COSTI, E. M.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Multiresidue analysis of sulfonamides in meat by supramolecular solvent microextraction, liquid chromatography and fluorescence detection and method validation according to the 2002/657/EC decision. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6250-6257, 2010.
- [41] SHAO, B.; DONG, D.; YONGNING, W.; JIANYING, HU; MENG, J.; XIAOMING, T., SHUKUN, X. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, v. 546, p. 174-181, 2005.
- [42] WON, S. Y.; LEE, C. H.; CHANG, H. S.; KIM, S. O.; LEE, S. H.; DONG, S. K. Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using hplc-pda and LC-MS/MS. **Food Control**, v. 22, p. 1101-1107, 2011.
- [43] HU, Y., HUI, M., YING, H. Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC-DAD, **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 76-81, 2012.

[44] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 62 p.

[45] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução - RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.

[46] CODEX ALIMENTARIUS. International food standards, Guidelines For The Validation Of Food Safety Control Measures Cac/Gl 69. London, 2008. P. 1-16.

[47] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. Rockville: 2001. 22 p.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Capítulo 2

Síntese de Polímeros Molecularmente Impressos (SDM-MIP) e estudo de sua aplicação como sorbente em Microextração com Sorbente Empacotado (MEPS) para a determinação de sulfonamidas em músculo de frango

Síntese de polímeros molecularmente impressos (SDM-MIP) e estudo de sua aplicação como sorbente em Microextração com Sorbente Empacotado (MEPS) para a determinação de Sulfonamidas em músculo de frango.

1 INTRODUÇÃO

A eficácia dos programas de controle de resíduos e contaminantes de substâncias químicas em alimentos baseia-se, principalmente, em métodos precisos, sensíveis e confiáveis para detecção e quantificação rápida destes compostos. Diferentes métodos analíticos têm sido empregados para monitoramento dessas substâncias, e no caso de medicamentos veterinários, como os antibióticos, são baseados principalmente na cromatografia líquida. [1-4]

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica comum de separação já bem estabelecida. A HPLC tem sido amplamente empregada para análises de resíduos e contaminantes em matrizes de origem biológica, uma vez que é capaz de separar misturas complexas contendo compostos de massas moleculares maiores e menores, assim como, com diferentes propriedades físico-químicas. Mesmo sendo uma excelente técnica para separação a HPLC, por si, só não resolve todos os problemas analíticos, principalmente com o aumento do número de resíduos e contaminantes presentes em matrizes complexas como no caso dos alimentos. A HPLC necessita de uma técnica confirmatória quanto à identidade dos compostos (análise qualitativa).

Dentre as várias opções existentes atualmente, a espectrometria de massas (MS) é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias. A Espectrometria de Massas permite uma visão global dos constituintes da matriz e sua aplicação possui crescente interesse na indústria alimentícia. No entanto, a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas é relativamente cara, e nem todos os laboratórios tem este conjunto de técnicas disponíveis. [5]

Uma alternativa a espectrometria de massas é a detecção por ultravioleta-visível (UV-Vis). Os detectores UV-Vis são simples e de baixo custo. No entanto, são menos seletivos quando comparados ao detector de massas, pois os interferentes da matriz que absorvam num

mesmo comprimento de onda e/ou apresentam mesmo tempo de retenção que os analitos de interesse podem interferir na análise. Assim, estudos envolvendo a otimização do desenvolvimento cromatográfico e um preparo de amostras mais eficientes são extremamente importantes para o sucesso da cromatografia líquida com detecção por UV-Vis. Mesmo com o avanço da tecnologia relacionada às técnicas de separações e detecções, o tratamento da amostra ainda é uma das etapas mais importantes do processo analítico. Um pré-tratamento da amostra eficiente é fundamental para alcançar bons resultados analíticos caso contrário, espécies interferentes provenientes da matriz poderão comprometer a determinação cromatográfica.

Métodos de preparo de amostras para antibióticos incluem extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), dentre outros [6,7]. Comparado com a LLE, a SPE pode reduzir o tempo de extração, bem como o consumo de solventes. Por consequência, a SPE é uma das técnicas de preparo de amostras mais utilizadas atualmente [6-8]. No entanto a SPE, se comparada a técnicas miniaturizadas, ainda consome grande quantidade de solventes orgânicos, de amostras, e de tempo.

Nas ultimas décadas tem havido uma crescente demanda pela redução no uso de solventes em laboratórios analíticos, conduzindo ao desenvolvimento de diversas técnicas alternativas de extração que incluem as técnicas miniaturizadas. Seguindo essa tendência para o preparo de amostras, surgiu a Microextração com Sorbente Empacotado (MEPS), uma forma de SPE miniaturizada, a qual foi introduzida por Abdel-Rehim [6, 9,10].

As metodologias de extração têm por objetivo a remoção dos analitos de interesse presentes na amostra, enquanto a etapa de limpeza tem a função de remover os possíveis interferentes presentes na matriz. Na etapa de *clean up* costuma-se usar diferentes tipos sorbentes. A escolha dos mesmos vai depender das características físico-químicas do analitos em estudo.

Dentre os diversos tipos de sorbentes, os polímeros molecularmente impressos (MIPs) tem se destacado nos últimos anos como materias promissores para aplicação em extração em fase sólida (SPE), procedimento nomeado MISPE. A aplicação do MISPE para extração e *clean up* de antibióticos tem demonstrado maior eficiência quando comparada a métodos tradicionais de extração. Os MIPs são materiais feitos sob medida, com seletividade predefinida para um dado analito e/ou para compostos com estruturas análogas para o qual ele foi sintetizado. Atualmente as pesquisas envolvendo a síntese e aplicação desses materias seletivos tem ocupado lugar de evidência no campo de preparo de amostras. [6,11-13]

1.1 Microextração com Sorbente Empacotado (MEPS)

A MEPS é uma técnica simples, rápida, com baixo consumo de amostra, maior fator de enriquecimento do analito e que pode ser automatizada. É uma técnica que se adequa aos princípios da química verde, por utilizar pequenos volumes de solventes e de amostras (10-250 μL).

Na MEPS, esquema representado na Figura 2.1, emprega-se de 1 a 4 mg de sorbente. Muitos destes são baseados em sílica (C2, C8 e C18), troca catiônica forte (SCX), copolímero poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), material de acesso restrito (RAM) e polímeros molecularmente impressos (MIPs). [6, 14, 15]

No sistema de Microextração com Sorbente Empacotado (MEPS) disponível comercialmente, ao contrário da SPE convencional, a fase sólida está num leito integrado numa seringa destinada ao uso de líquido ou gases (tipo *Gastight*®) permitindo, assim, a manipulação de baixos volumes de amostra e solvente. [16]

Figura 2.1 - Esquema representativo do MEPS comercial.

Fonte: ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2569–2580, 2010.

Basicamente ela consiste em uma forma miniaturizada de SPE, onde o cartucho convencional é substituído por uma espécie de coluna miniaturizada (denominada BIN) que é adaptada entre a agulha e o corpo de uma seringa de injeção de HPLC ou GC. Os procedimentos de análise de maneira análoga à SPE consistem de amostragem, lavagem, eluição e injeção no sistema cromatográfico. Na Figura 2.2, é descrito um protocolo típico de uso do MEPS para análises de sangue e plasma.

Figura 2.2 - Protocolo MEPS de Preparo de Amostra de sangue e plasma usando como sorbentes C4, C8 ou C18.

Fonte: ABDEL-REHIM, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v.701, p. 119, 2011

As mesmas razões que fizeram a SPE convencional ser tão atraente para o estudo de medicamentos em amostras biológicas são aplicáveis a Microextração Empacotada Por Sorbentes (MEPS), pois ambos os métodos são baseados no uso dos mesmos adsorventes. O MEPS se adéqua a maioria dos métodos de SPE existentes, mas com a vantagem de fazer uso de menores volumes de solvente e de amostras [16]

Esta nova técnica pode ser usada para matrizes complexas (como plasma, urina, e em solventes orgânicos), sem problemas, o que não é sempre o caso com a SPME, pois a fibra da SPME é bastante sensível a natureza da matriz. [14, 16]

A aplicabilidade da MEPS vem sendo destacada em diferentes estudos. Uma aplicação bem sucedida da microextração com sorbente foi descrita em 2011, por Salami e Queiroz [17]. Neste trabalho os autores analisaram resíduos de Sulfonamidas em ovos e obtiveram taxas de recuperação maiores que 94%, bem como os dados de precisão inter-ensaio, com coeficientes de variação inferiores a 10%. Outros trabalhos empregando a MEPS, como determinação de ácido ascórbico em bebidas, fenóis em vinho, flavonóides em vinho, hidrocarbonetos policíclicos em água podem ser citados, porém o destaque principal para as aplicações são as análises de fármacos em plasma, sangue e urina. [14,15, 17-22].

1.2 Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)

Apesar do grande desenvolvimento da instrumentação analítica durante as últimas duas décadas, a preparação da amostra é, ainda hoje em dia, considerada a etapa principal de todo o processo de análise [23]. O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande relevância em diferentes áreas do conhecimento, contemplando, por ex., os setores alimentício, biotecnológico, ambiental, farmacêutico, entre outros [24]. Neste sentido, esforços têm sido conduzidos com a finalidade da melhoria da seletividade durante a extração e/ou limpeza dos extratos de amostras. [23]

Os Polímeros Molecularmente Impressos (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers* - MIPs) representam uma nova classe de materiais sintéticos, os quais podem reconhecer seletivamente uma molécula específica, ou substâncias análogas. Os MIPs são polímeros estáveis com capacidade de reconhecimento molecular, fornecidos pela presença de um molde, assim, são materiais excelentes para proporcionar seletividade para a preparação da amostra. As estratégias analíticas que permitem obter estes materiais seletivos baseiam-se no reconhecimento biomolecular de muitos processos biológicos, como o de replicação de DNA, interação antígeno-anticorpo, enzima-substrato e muitos outros sistemas [23-25]. O fenômeno

do reconhecimento molecular pode ser definido como a ligação preferencial de um composto a um receptor com alta seletividade sobre outros analitos. [26]

Os MIPs são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor da molécula molde. Após a polimerização a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são analitos voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho do analito. [27]

A síntese de MIPs (Figura 2.3) consiste em misturar o monômero contendo grupos funcionais complementares àqueles da molécula molde, o que permite formar em solução o complexo “monômero-molécula molde”, por meio de interações (covalentes ou não covalentes) entre os respectivos grupos funcionais complementares. Posteriormente, são adicionados ao meio reacional o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar de polimerização. Finalmente, a polimerização é induzida por meio de calor e/ou luz UV na ausência de oxigênio com posterior remoção da Molécula Molde, também chamada de *Template*. [27,28]

Figura 2.3 - Síntese Convencional de Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs).

Fonte: PARISI, O. P.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PUOCI, F.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G; PICCI, N. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. **Journal of Polymer Research**, v. 17, p. 355–362, 2010.

O processo de obtenção do polímero mais comum é o em “bulk”, onde, após a reação o polímero obtido é triturado, resultando em pequenas partículas com impressão molecular, normalmente na escala de micrômetros. O controle do tamanho dessas partículas pode também ser realizado por meio de peneiras e/ou por sedimentação. Entretanto, este procedimento consome tempo e implica uma perda de material, obtendo-se apenas aproximadamente 20% de partículas úteis. [27, 30]

A impressão molecular pode ser classificada, de acordo com o tipo de interações, entre monômeros funcionais e analito alvo na mistura de pré-polimerização, podendo ser: i) impressão covalente; ii) impressão não-covalente e iii) impressão semi-covalente (Figura 2.4). [31]

O procedimento covalente foi introduzido por Wulff e Sarchan [27, 32], e envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre Molécula Molde e Monômeros Funcionais, antes da polimerização. A principal característica desses polímeros é sua alta seletividade, consequência da alta estabilidade das ligações formadas entre *template* (Molécula Molde) e monômeros, o que leva a formação de uma grande quantidade de sítios de ligação homogêneos, minimizando a existência de sítios de ligação não específicos. Todavia, o processo de retirada da Molécula Molde do sítio de ligação é difícil, sendo necessário que a Molécula Molde seja removida do polímero por clivagem das ligações covalentes. [31, 32]

Figura 2.4 - Protocolo da Impressão Molecular não covalente e impressão covalente/semi-covalente.

Fonte: SILVA, Raquel. G. C. **Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processos sol-gel**. 2009. 125f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

O procedimento não covalente foi introduzido em 1981, por *Arshady e Mosbach*, os quais reportaram o primeiro trabalho em que as interação entre grupos funcionais específicos no Monômero Funcional e a Molécula Molde ocorria por meio de ligações não covalente, permitindo que o processo de desligamento fosse suscetível a fatores como modificação do pH, força iônica, solvente, dentre outros. As interações não-covalentes podem ser do tipo ligações de hidrogênio, iônicas e interações hidrofóbicas, entre outra. [32, 33]

Mais recentemente, em 1995, Whitcombe e colaboradores, propuseram um novo MIP, onde a Molécula Molde é covalentemente ligada ao Monômero Funcional durante o processo da síntese, mas o religamento da Molécula Molde ou compostos análogos é baseado em ligações não-covalentes. Este procedimento é conhecido como semi-covalente. [30-33] Atualmente o procedimento não-covalente é o mais utilizado para o preparo do MIPs, pois é mais simples e aplicável a um numero maior de compostos. [33, 34] A tabela 2.1 mostra as diferenças entre os procedimentos de impressão molecular covalente e não-covalente.

A síntese de MIPs constitui, por si só, um processo complexo, e está sujeita a um número acentuado de variáveis experimentais como, por exemplo, a natureza e a concentração da molécula molde, monômeros funcionais, reagentes de ligação cruzada, solventes, iniciador. [32] Sendo assim, o primeiro passo para síntese dos MIP consiste em estabelecer criteriosamente a escolha do Monômero e da Molécula Molde.

Tabela 2.1 - Comparação entre sínteses de Polimeros Molecularmente Impressos por Impressão não-covalente e covalente.

Impressão não-covalente	Impressão covalente
Facilidade no preparo e aplicação a um maior número de Molécula Molde	Dificuldade em encontrar um sistema para cada Molécula Molde / clivagem da Molécula Molde
10 a 15 % das cavidades vazias podem ser reocupadas	80 a 90 % das cavidades vazias podem ser reocupadas
Um excesso de grupos ligantes pode ser distribuído não especificamente	90 % das moléculas Molde incorporadas ao MIP podem ser clivadas
Interações não covalente são rapidamente reversíveis	O religamento da Molécula Molde pode não ser rápida ou reversível
Mais de 75 % dos grupos ligantes estão situados fora das cavidades vazias	Grupos ligantes estão localizados nas cavidades

Fonte: SILVA, Raquel. G. C. **Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processos sol-gel**. 2009. 125f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

A Molécula Molde assume uma importância fundamental, já que é responsável pela definição da organização espacial dos grupos funcionais dos monômeros e, portanto necessita conter em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monômeros, afim de formar uma espécie de complexo estável. Além disso, deve ser estável e quimicamente inerte durante o processo de polimerização, e não deve interferir em eventuais quantificações do analito de interesse. [30-33]

Os Monômeros Funcionais são responsáveis pelas interações que se estabelecem nos sítios de reconhecimento. A escolha do monômero funcional vai depender da natureza do analito. Analitos que possuem grupos básicos interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, como por exemplo, o Ácido Metacrílico (MAA), e em contrapartida, analitos ácidos interagem preferencialmente com monômeros com caráter básico como o 4-vinilpiridina (VP). [25]

Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente vários monômeros funcionais com estruturas e polaridades diversas. Na Tabela 2 são apresentadas as estruturas químicas de alguns monômeros mais empregados para preparo dos MIP, sendo que dentre estes, o ácido metaacrílico (MAA) é o mais utilizado. [25]

O solvente também influencia a estabilidade da formação do complexo “analito-monômero”. O solvente é o meio onde estão presentes todos os componentes que intervêm no processo de polimerização (molécula-molde, monômeros funcionais, reagente reticulante e iniciador). No entanto, apesar de fornecer um meio onde analitos e monômeros sejam solúveis, este não deve interferir na interação “analito-monômero”. Assim, o solvente adequado deve ser apolar, aprótico e de baixa constante dielétrica (por exemplo, clorofórmio e tolueno). A presença ou ausência do solvente determina as características morfológicas do polímero de impressão molecular formado, já que é responsável pela formação dos poros nos polímeros. É importante salientar que polímeros pouco porosos e com pequena área superficial apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular. [25, 30-34]

Para que a eficiência da impressão molecular seja assegurada é necessário que a reatividade do reagente capaz de formar ligações cruzadas seja similar a reatividade dos monômeros funcionais. O reagente reticulante é usado para promover as ligações cruzadas no polímero formando, assim, uma estrutura rígida tridimensional ao redor da molécula molde, garantindo estabilidade ao complexo “analito-monômero”. Desse modo, o reagente de ligação cruzada é responsável pelo controle da morfologia do MIP além de estabilizar os sítios de ligação e a estrutura mecânica do polímero.

Tabela 2.2 - Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP.

Monômero funcional	Nome do Monômero	Tipo de interação com o analito
Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
Ácido meta-acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
Ácido p-vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
Ácido acrilamidosulfônico	Interação iônica
Amino metacrilaminada	Interação iônica
4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
4-Vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
1-Vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
Acrilamida	Ligação de hidrogênio

Fonte: TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de mip (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

Diversos reagentes de ligação cruzada têm sido usados, porém o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) tem sido o reagente mais utilizado, pois promove a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa durante a síntese. Na Figura 2.5, são apresentados os reagentes de ligação cruzada tipicamente empregados na impressão molecular.

Outro importante reagente empregado na síntese de MIPS é o iniciador radicalar, cuja função é criar radicais livres para possibilitar o início e a manutenção da reação de polimerização. A escolha destes reagentes depende da natureza de interação “analito-monômero”. No caso em que a complexação é conduzida por ligação de hidrogênio é preferível efetuar a polimerização em baixas temperaturas e, nestas circunstâncias, os iniciadores radicalares ativos fotoquimicamente são mais indicados. O iniciador radicalar 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) é o mais empregado na síntese dos MIP, mas outros também podem ser utilizados (Figura 2.6). [25]

Figura 2.5 - Estruturas moleculares de alguns reagentes de ligação cruzada empregados em síntese de MIPS. [25, 33]

Figura 2.6 - Estrutura química dos iniciadores radiculares mais empregados na síntese de MIPs. [25, 33]

Vários são os exemplos da aplicação bem sucedida de MISPE descritos na literatura. Na maioria dos casos MISPE tem sido usado no modo off-line para o *clean up* e enriquecimento da amostra, mas há casos em que se tem empregado sistema online. [35] A aplicação do MIPs como sorbente seletivo tem apresentado sucesso para extração de uma variedade de analitos em diferentes matrizes complexas, for exemplo, alimentos, sangue, urina, águas superficiais, etc. [35-38]

Há na literatura vários estudos envolvendo a síntese de polímeros molecularmente impressos para analitos da classe da Sulfonamidas para aplicação como fase estacionaria para HPLC e como adsorvente para extração em fase solida (SPE). No entanto, há poucas publicações relatando análises de sulfonamidas em tecido animal usando métodos baseados em MIP. [35, 39- 47]

Embora os MIPs possam ser obtidos de forma simples e rápida, através da polimerização de um monômero funcional e um agente de ligação cruzada na presença de uma molécula molde (template), como foi representada anteriormente na Figura 2.3, a completa remoção da molécula molde é difícil. Assim, traços da mesma podem permanecer no MIPs prejudicando a exatidão e precisão do ensaio analítico para análises de traços. Para

contornar esse problema tem-se procurado usar como alternativa molécula molde com estruturas análogas ao analito de interesse [28] Outro inconveniente é que apesar de apresentar sítios seletivos para molécula molde, e seus análogos, os MIPs apresentam sítios não específicos capazes de reterem macromoléculas presentes na matriz, como proteínas e lipídios. É sabido que nas análises de matrizes biológicas a remoção das proteínas é extremamente importante para evitar sua precipitação na coluna analítica diminuindo seu tempo útil. [48].

Baseando-se na MISPE, o objetivo deste trabalho foi aliar as características dos MIPs, polímeros capazes de reterem seletivamente uma dada molécula e/ou suas moléculas análogas, a uma técnica de extração miniaturizada, MEPS, numa única metodologia de preparo de amostra.

A combinação das vantagens do sorbente Sulfonamida-MIP, juntamente com a técnica de extração MEPS – considerada ambientalmente “amigável” – permite a obtenção de métodos mais seletivos, sensíveis e baixo custo para o preparo de amostras complexas, possibilitando o uso de técnicas de detecção menos seletivas, como é o caso da HPLC-UV.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi sintetizar um polímero molecularmente impresso usando como molécula molde a sulfadimetoxina (SDM-MIP) e avaliar sua aplicação como sorbente nos dispositivos MEPS para determinação de resíduos de antibióticos da classe das sulfonamidas em músculo de frango, utilizando-se da cromatografia líquida com detecção por ultravioleta-visível como técnica de análise.

3. JUSTIFICATIVAS

O uso indevido de medicamento veterinário gera problemas de saúde pública, além de envolver aspectos econômicos, pois a presença de resíduos dessas substâncias em alimentos pode acarretar em barreiras nas exportações. Isto repercute seriamente na economia brasileira, pois os alimentos constituem uma das principais commodities de exportação do nosso país.

Neste contexto, o desenvolvimento de novas fases com alta seletividade é extremamente importante quando há a necessidade de obter amostras mais limpas, principalmente quando não se dispõe de técnicas seletivas de detecção, assim como há a necessidade do uso de técnicas que se adéquem aos princípios da química verde, como é o caso da Microextração com Sorbentes Empacotado (MEPS).

Embora o uso de MIPs como material sorbente em MISPE na análise de antibióticos tenha sido bastante estudado, o uso do SDM-MIP como sorbente em MEPS para a classe das sulfonamidas ainda não foi relatado, constando na literatura apenas dois trabalhos relatando a aplicação do MIPs-MEPS [11, 15]. Desta forma, justifica-se o estudo deste tema no presente trabalho.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Padrões e Reagentes

Os padrões analíticos sulfadimetoxina (SDM), sulfamerazina (SMR), sulfametoxazol (SMX), sulfaclorpiridazina (SCP), sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ), sulfadiazina (SDZ) e sulfacetamida (SCM), foram adquiridas da *Sigma-Aldrich* (Alemanha).

Sulfato de magnésio (J.T. Baker, Mexico), acetato de sódio (J.T. Baker, México), ácido fórmico (Mallinckrodt, Xalostoc, México), acetonitrila (Tedia, Fairfield, EUA), metanol (Tedia, Fairfield, EUA), acetonitrila (J.T. Baker), metanol (J.T. Baker), água deionizada Milli-Q (Millipore-Bedford, EUA), foram também utilizadas.

Os reagentes, Ácido metacrílico (MAA), Etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 2,2-azobis-isobutironitrila (AIBN) foram adquiridas da *Sigma-Aldrich* (Alemanha).

4.2 Instrumentação

Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285; Cromatógrafo líquido (HPLC), série Prominence 20A da Shimadzu, com detector UV/Vis; Coluna analítica kinetex[®] C18 (100 mm × 2,1 mm × 2,6 µm); Sistema de ultrapurificação de água, modelos Elga Purelab Ultra e Option-S; Vortex; pHmetro Micronal modelo B374; Centrifuga eppendorf.

4.3 Metodologia

4.3.1 Preparo dos Padrões Analíticos

As soluções estoque (500 mg L⁻¹) dos medicamentos veterinários foram preparadas em ACN:MeOH (50:50) e armazenadas a -18°C. A solução contendo a mistura dos compostos (Solução Mix) foi obtida diluindo-se a solução estoque em ACN:H₂O (10:90) para uma concentração final de 1 mg L⁻¹ de cada componente. Estas soluções foram armazenadas em refrigerador. As matrizes (músculo de frango branco) utilizadas no estudo foram obtidas por doação e adquiridas em mercado local.

4.3.2 Condições cromatográficas

O método cromatográfico foi desenvolvido num sistema HPLC com detecção por UV/Vis e Coluna analítica kinetex[®] C18 (100 mm × 2,1 mm × 2,6 µm), empregando padrões analíticos de sulfonamidas nas concentrações de 1 mg/L. As condições estão descritas a seguir:

- Temperatura da coluna: 40°C
- Fase Móvel: (A) Água 0,1% de Ácido Fórmico e (B) Acetonitrila (ACN)
- Volume de injeção: 5 µL
- Fluxo da fase Móvel: 0,30 mL/min
- Modo de eluição: gradiente de concentração
- Comprimento de onda: 270 nm e 267 nm

A Figura 2.7 mostra o gradiente de eluição para separação cromatográfica para as sulfonamidas.

Figura 2.7 - Gradiente de eluição cromatográfica

4.3.3 Síntese do SDM-MIP e do NIP (Polímero Não Impresso)

A síntese do Sulfadimetoxina-MIP (SDM-MIP) foi realizada pelo método *in bulk*, descrito por N. Zheng e colaboradores (2004) com adaptações, empregando a abordagem não-covalente como esquematizada na Figura 2.8. No procedimento geral foram adicionados 1,16 mmol a molécula molde (sulfadimetoxina), 9,2 mmol do monômero funcional (MAA), 15 mL

do solvente porogênico (Acetonitrila), 46 mmol do agente de ligação cruzada (EDGMA) e 75,0 mg do iniciador radicalar (AIBN). A mistura reagente foi então submetida ao fluxo de nitrogênio por 5 minutos para promover a remoção do oxigênio. O frasco foi imediatamente selado e deixado num banho de óleo a 60°C e agitação em agitador magnético por 24 horas até total polimerização (Figura 2.9). [35]

O polímero formado foi triturado e peneirado. O material foi então lavado para retirada da molécula molde usando um extrator *Soxhlet* e como solvente uma mistura de Acetonitrila/metanol 10% Ácido fórmico. O polímero permaneceu neste sistema até que a Sulfadimetoxina não pode ser mais detectada por Cromatografia Líquida (LC-UV/vis).

Por fim, as partículas foram secas a uma temperatura de aproximadamente 70°C e novamente peneiradas. Partículas com tamanhos de 200 a 100 mesh foram separadas e aplicadas como adsorvente na MEPS. Similarmente ao SDM-MIP, o NIP (Polímero Não Impresso) foi sintetizado, porém na ausência da molécula molde (Sulfadimetoxina).

Figura 2.8 - Síntese da Sulfadimetoxina-MIP (SDM-MIP).

Fonte: PARISI, O. P.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PUOCI, F.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G; PICCI, N. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. **Journal of Polymer Research**, v. 17, p. 355–362, 2010.

Figura 2.9 - Síntese do Polímero Molecularmente Impresso (SDM-MIP) e Não Impresso (NIP).

4.3.4 Caracterização do SDM-MIP e NIP (Polímero Não Impresso)

Após a síntese do SDM-MIP, a morfologia do material polimérico foi caracterizada utilizando microscopia eletrônica de varredura e a espectrometria de infravermelho. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss-Leica/440), operando a 20 kV, as amostras foram banhadas a ouro para que houvesse visualização das mesmas, devido sua não condutividade elétrica. Os espectros de infravermelho (FT-IR) foram obtidos empregando discos de brometo de potássio (KBr) para preparar as amostras dos polímeros e a faixa espectral avaliada foi de 400 a 4000 cm^{-1} no equipamento Bomem MB-102.

4.3.5 Preparo da Amostra

Com as condições cromatográficas otimizadas, iniciou-se a otimização do processo de extração e *clean up*, utilizando a SDM-MIP-MEPS. Diversos experimentos foram realizados variando os parâmetros para a otimização do processo de extração e *clean up*. Para tais procedimentos, utilizaram-se amostras de músculo de frango isenta de sulfonamidas.

4.3.5.1 Extração

A metodologia de extração da amostra consistiu em pesagem de 500 mg de amostra de músculo de frango em tubo eppendorf de 2,0 mL; adição de 1,0 mL de solvente; agitação em vortex por 1 minuto e ultrasonificação por 5 minutos; centrifugação por 5 min a 5000 rpm; transferência do sobrenadante para eppendorf de 2,0 mL e secagem sob fluxo de nitrogênio para troca de solvente; reconstituição da amostra em solvente adequado para aplicação na MEPS.

4.3.5.2 Clean up empregando dispositivos MEPS

O dispositivo usado na Microextração Empacotada por sorventes (MEPS) foi “desenvolvido” em nosso laboratório (CROMA-IQSC/USP), baseando-se no dispositivo comercial [16]. O dispositivo foi adaptado para tornar possível seu uso com diferentes sorbentes, como o caso dos MIPS. O processo de extração e *clean up* usando o SDM-MIP-MEPS, esta apresentado na Figura 2.10.

Todas as etapas de *clean up* apresentadas na foram otimizadas a fim de se obter as melhores condições para assim efetuar o estudo de validação da metodologia.

4.3.6 Avaliação da seletividade do SDM-MIP e NIP

Os testes para avaliação da capacidade de reconhecimento do NIP e sua comparação com o SDM-MIP foram realizados empregando os dispositivos MEPS, conforme o protocolo realizado para o SDM-MIP (Figura 2.10). O NIP foi submetido aos testes de seletividade a fim de avaliar se sítios não específicos criados durante a síntese do material poderiam reter os analitos com a mesma eficiência que para o MIP.

Figura 2.10 - Protocolo de Extração e *Clean up* otimizado usando SDM-MIP-MEPS

4.3.7 Validação da Metodologia

O estudo de validação foi realizado utilizando os parâmetros descritos na *seção 3.4 do Capítulo 1*. Sendo assim, a metodologia analítica foi validada baseando-se na Diretiva 2002/657/EC [49], sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, recuperação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), robustez, seletividade/especificidade.

Para avaliação da linearidade do método, foram construídas curvas analíticas *matrix-matched* para cada um dos analitos. A robustez do método foi realizada utilizando a

abordagem de Youden. A Tabela 2.3 apresenta as pequenas alterações nas condições experimentais do método para proceder à avaliação da robustez. Todos os demais parâmetros seguem como descritos na *seção 3.4 do Capítulo 1*.

O efeito de memória (*carry over*) também foi avaliado realizando a injeção no nível de 300 µg/kg e em seguida a injeção do branco do músculo de frango.

Tabela 2.3 - Fatores avaliados na robustez do método

Parâmetros	Condição Nominal		Variação	
<i>Número de ciclos de amostragem (draw-eject)</i>	12	A	10	a
<i>Número de ciclos no processo de eluição (draw-eject)</i>	4	B	6	b
<i>Concentração ácida do solvente de eluição</i>	1%	C	0,8	c
<i>Comprimento de onda</i>	270 nm	D	267 nm	d
<i>Temperatura da coluna cromatográfica</i>	40°C	E	38°C	e
<i>Volume do solvente de eluição</i>	200 µL	F	190 µL	f
<i>Volume do solvente de limpeza</i>	100 µL	G	110 µL	g

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e avaliação da seletividade do SDM-MIP e NIP

A caracterização estrutural dos materiais impresso e não impresso foi realizada por técnicas espectroscópicas de análises. As medidas de absorção no infravermelho para o SDM-MIP e NIP estão apresentadas na Figura 2.11. Observa-se que os materiais apresentam claras similaridades. Bandas por volta de $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ referem-se ao estiramento O-H, que pode ou não estar sobreposta com os estiramentos C-H (**1**). As bandas referentes ao grupo carbonila estão por volta de $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (**2**), já as bandas referentes às ligações C-O estão por volta de $1100\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (**3**).

Na Figura 2.12 temos imagens da MEV das partículas do polímero MIP e do NIP sintetizado. Podemos observar para o SDM-MIP as partículas apresentaram uma superfície mais porosa quando comparada ao NIP.

Figura 2.11 - Espectro de absorção no infravermelho para SDM-MIP e NIP.

Figura 2.12 - Imagem de MEV da superfície do SDM-MIP e do NIP sintetizado.

5.2 Otimização do preparo da amostra

Analizando os dados obtidos apresentados na Figura 2.13, observa-se uma diminuição na porcentagem de recuperação à medida que se eleva os níveis de fortificação. Para sulfadimetoxina, por exemplo, a porcentagem de recuperação nos níveis, 50 µg/kg, 100 µg/kg e 150 µg/kg foram respectivamente 65,8; 42,7; 35,6%. Assim sendo, há uma melhor recuperação dos analitos em níveis de fortificação mais baixos. Esta tendência é repetida para todos os demais analitos.

Considerando que a massa dos analitos presente em uma alíquota de 200 µL de um extrato numa concentração de 50 µg/kg é de 10 ng, de 100 µg/kg é de 20ng e 150 µg/kg é 30 ng, temos que, uma possível explicação para tal fenômeno seria a saturação dos sítios ativos do sorbente (MIP), pois à medida que percolamos, através do SDM-MIP-MEPS, maiores massas dos analitos, ocorre um decréscimo na recuperação dos mesmos. Diante disto, fez-se um estudo fortificando as amostras com apenas quatro SAs, e empregando o mesmo procedimento de extração e *clean up*. Diminuindo o numero de compostos, e mantendo o volume de amostragem (200 µL), diminui-se também a massa total de analitos a ser percolado através do SDM-MIP.

Dentre as oito SAs, foram retiradas aquelas que apresentavam menor resposta de sinal quando analisadas por LC-UV. Na Figura 2.14 são apresentados os valores de recuperações para as SAs, nas concentrações de 50, 100, 150 µg/kg. Pode-se observar um pequeno aumento

nas recuperações em relação ao estudo mostrado na Figura 2.13 – em torno de 5 %. Comparando a Figura 2.13 com a 2.14, é possível observar que apesar de ter havido progresso o perfil para ambos os estudos manteve-se praticamente idêntico, salvo a discrepância para a Sulfaclopiridazina, a qual apresentou certa harmonia entre as recuperações nos três níveis de fortificação empregados.

Figura 2.13 - Recuperações em três níveis de fortificação para 7 sulfonamidas na matriz (200 µL)

Figura 2.14 - Recuperações em três níveis de fortificação para 4 sulfonamidas na matriz (200 µL)

Ainda buscando verificar a hipótese de saturação dos sítios ativos, fez-se um estudo reduzindo o volume de amostragem para 100 µL. A Figura 2.15 apresenta as recuperações para os quatro analitos. É possível verificar que houve um aumento nas recuperações para todos analitos, o que confirma que possivelmente estava havendo saturação nos sítios seletivos do SDM-MIP, o que justifica em parte a hipótese.

Por tratar-se de uma matriz complexa, algumas proteínas e lipídios presentes no extrato podem dificultar o acesso dos analitos aos sítios seletivos, o que representa uma diminuição na capacidade de reconhecimento de MIP, e justifica, em parte, os baixos valores de recuperação. Portanto, com o intuito de avaliar a influência dos interferentes da matriz sobre a eficiência do MIPs, foram feitos estudos de recuperação com os analitos em solvente. Avaliando a Figura 2.16 é possível concluir que parte da ineficiência de extração empregando o SDM-MIP-MEPS deve-se aos interferentes presentes na matriz. É importante salientar que muitos estudos que utilizam o MISPE para extração de analitos em tecidos animal tem aplicado um pré-tratamento da amostra usando sorbentes comerciais, como exemplo, C18, OASIS, HLB, Extrelut 20, devido à adsorção não específica dos interferentes presentes na matriz.

Segundo Komiyama e colaboradores numa impressão não-covalente de 10 a 15 % das cavidades vazias estão seletivamente disponíveis, além de haver a formação de sítios não específicos que facilitam a adsorção de interferentes presentes na matriz. [34]

Figura 2.15 - Recuperações em três níveis de fortificação para 4 sulfonamidas na matriz (100 µL)

Diante deste contexto, e considerando que a capacidade do BIN utilizado neste estudo era de aproximadamente 2,0 mg de sorbente, optou-se por fazer uma pequena modificação no sistema de extração (MEPS), mais especificamente, aumentando o volume do cartucho (BIN) para que no mesmo pudesse ser utilizado uma maior quantidade de sorbente e, conseqüentemente, um número maior de sítios seletivos estariam disponíveis. Dois novos BINs foram produzidos, um com a capacidade em torno de 4,0 mg e outro de 6,0 mg.

Estudos empregando o BIN com capacidade para 6,0 mg apresentou problemas de bolhas durante o procedimento de extração além de alta pressão. O cartucho de 4,0 mg no entanto, apresentou-se mais adequado para dar continuidade a otimização.

Após essa pequena modificação no sistema foi possível obter recuperações dentro da faixa aceitável (70 a 110%) e, portanto, fazer um estudo avaliando alguns parâmetros de validação.

5.3 Avaliação da seletividade do SDM-MIP e NIP

A síntese SDM-MIP usando o Acido Metacrilico como monômero mostrou boa adsorção para a molécula molde e seus análogos estruturais. Em contrapartida o Polímero Não Impresso (NIP) não apresentou boa capacidade de reconhecimento. Na Figura 2.17 e 2.18 podemos ver a separação cromatográfica obtida empregando o SDM-MIP e o NIP, respectivamente.

Figura 2.16 - Recuperações em três níveis de fortificação para 4 sulfonamidas em solvente (100 μ L)

Figura 2.17 – Cromatograma típico para SDM-MIP produzido.

Figura 2.18 – Cromatograma para o NIP produzido.

Este resultado mostra que existe uma substancial interação entre o MAA e a SDM no polímero SDM-MIP, o que é consistente com a possibilidade de que o átomo de nitrogênio presente na molécula sulfadimetoxina pode formar um complexo com o MAA através de ligação de hidrogênio e interações iônicas e que, após esta polimerização, o *template* ao ser removido do MIP, deixa cavidades com a forma e arranjos dos grupos funcionais para a SDM (Figura 2.19). Essas cavidades podem reconhecer a SDM e seus análogos estruturais o que não ocorre com o NIP, pois o mesmo não apresenta os sítios com capacidade de reconhecimento específico para a SDM.

Figura 2.19 – Possível estrutura dos sítios de ligação para SDM no MIP sintetizado.

5.4 Validação da Metodologia

A construção da curva analítica foi feita usando extrato da própria matriz, para garantir a presença de todos os coextratos presentes na amostra, e que eventualmente possam interferir nas análises. Portanto, inicialmente foram construídas curvas analíticas *matrix matched* nas concentrações de 65, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A Tabela 2.4 apresenta os valores da faixa de quantificação analítica, as equações da regressão linear e os coeficientes de determinação (r^2) para cada analito. Nota-se que o coeficiente de determinação (r^2) apresentou valor acima de 0,98 atendendo recomendações de órgãos como ANVISA e FDA indicando, assim, linearidade na faixa trabalhada. [34-37]

O limite de detecção (LOD) na matriz ficou entre 24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 39 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e o limite de quantificação (LOQ) ficou entre 71,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 112 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O cálculo do limite de detecção (LOD), foi baseado na razão sinal ruído ($3 \times S/N$) e o limite de quantificação (LOQ), baseado na razão sinal ruído ($10 \times S/N$). Na Tabela 2.5 são apresentados os valores para o LOD, LOQ e tempo de retenção para as cinco sulfonamidas.

Tabela 2.4 - Dados da linearidade para detecção das sulfonamidas em músculo de frango.

Compostos	Linearidade		
	Faixa ($\mu\text{g/kg}$)	Equação	R^2
Sulfamerazina	65-400	$y = 10,45x + 853,4$	0,995
Sulfametazina	65-400	$y = 8,473x + 225,08$	0,995
Sulfaclorpiridazina	65-400	$y = 10,49x + 151,6$	0,996
Sulfametoxazol	65-400	$y = 13,41x + 1049,0$	0,991
Sulfadimetoxina	65-400	$y = 11,07x + 446,0$	0,993

Tabela 2.5 – Limites de detecção e Limites de Quantificação para as Sulfonamidas estudadas.

Compostos	tr (min)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Sulfamerazina	6.196	39	112
Sulfametazina	7.348	35	108
Sulfaclorpiridazina	8.506	26	76,7
Sulfametoxazol	9.068	24	71,3
Sulfadimetoxina	11.169	25	73,3

O ensaio de recuperação foi realizado fortificando o músculo de frango em três níveis de concentração ao redor do LMR (100 µg/kg) para cinco SAs, ou seja, em 50, 100 e 150 µg/kg. Na Tabela 2.6 estão apresentados os valores de recuperação média para cada analito.

Os valores de recuperação obtidos estão dentro dos padrões aceitáveis de 70 a 110% para quatro das cinco SAs estudadas. No entanto, os coeficientes de variação (CV) foram de no máximo 7,3%, abaixo do máximo recomendado (20 %).

Tabela 2.6 - Estudo de Recuperação da metodologia.

Compostos	Concentração (µg/kg)	Rec Media (%) n=6	DP (%) n=6	CV (%) n=6
<i>Sulfametazina</i>	50	71,1	3,3	4,6
	100	70,0	1,9	2,6
	150	73,3	2,2	3,0
<i>Sulfamerazina</i>	50	68,4	1,9	2,8
	100	68,1	5,0	7,3
	150	71,2	1,7	2,4
<i>Sulfaclorpiridazina</i>	50	81,0	2,8	3,5
	100	80,0	2,9	3,7
	150	81,3	1,8	2,3
<i>Sulfametoxazol</i>	50	90,9	1,9	2,1
	100	88,0	4,8	5,5
	150	90,3	3,6	3,9
<i>Sulfadimetoxina</i>	50	91,7	4,2	4,5
	100	91,1	4,0	4,3
	150	92,5	4,7	5,1

Os ensaios de precisão foram obtidos por meio de ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade do método analítico. Os valores foram satisfatórios quando comparados aos critérios estabelecidos. Os coeficientes de variação (CV) calculados para cada composto estão resumidos na Tabela 2.7. Pode-se observar que os CV foram sempre inferiores a 20%, para todos os medicamentos veterinários, que indica um bom desempenho do método desenvolvido.

Vale ressaltar que o MEPS pode ser utilizado no modo manual, ou automático acoplado a sistemas cromatográficos. A operação manual demanda tempo para aquisição da prática de operação, devido a dificuldade em manter exatamente as mesmas condições de extração, como é o caso da velocidade requerida em cada ciclo. Portanto neste caso os coeficientes de variação podem ser mais elevados.

Tabela 2.7 - Estudos de precisão

Compostos	Concentração (µg/kg)	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
		Rec Media (%) n=6	CV (%) n=6	Rec Media (%) n=6	CV (%) n=6
<i>Sulfametazina</i>	50	73,0	2,5	71,8	1,0
	100	70,0	0,1	73,3	0,7
	150	73,2	2,0	74,3	0,8
<i>Sulfamerazina</i>	50	67,7	1,2	68,0	2,7
	100	66,7	1,9	67,3	3,0
	150	70,8	0,5	71,8	0,3
<i>Sulfaclopiridazina</i>	50	82,2	2,3	83,5	0,5
	100	80,4	0,7	83,8	2,3
	150	82,7	1,6	83,1	1,1
<i>Sulfametoxazol</i>	50	90,6	1,9	88,6	0,7
	100	88,4	4,2	88,8	1,6
	150	90,8	3,2	92,3	1,8
<i>Sulfadimetoxina</i>	50	90,8	1,7	90,2	4,2
	100	90,7	3,3	91,5	2,7
	150	93,4	1,1	92,8	0,5

A robustez do método é um parâmetro que avalia como o método analítico é influenciado frente a pequenas alterações na metodologia. Os ensaios de robustez foram realizados no nível médio de fortificação (100 µg/kg). Quando o desvio padrão da robustez é significativamente maior que o desvio padrão do método realizado nas condições de reprodutibilidade intralaboratorial, pode-se deduzir que o conjunto de fatores escolhidos tem influência no resultado, mesmo que não haja influência significativa de cada fator isoladamente. Através dos dados apresentados na Tabela 2.8, podemos concluir que o método não se apresentou robusto frente às alterações para a Sulfametazina e Sulfamerazina.

Para substâncias com LMR definidos como as SAs o CC α e CC β são sempre maiores que o LMR devendo, no entanto ser o mais próximo possível. O CC β deverá ficar no máximo 30% acima do LMR. Portanto os valores para o limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β) apresentaram-se dentro da faixa aceitável (Tabela 2.9).

Tabela 2.8 - Robustez do Método

Compostos	Desvio Padrão (%)	
	Robustez	Reprodutibilidade Interlaboratorial
<i>Sulfametazina</i>	1,1	0,1
<i>Sulfamerazina</i>	1,4	1,2
<i>Sulfaclorpiridazina</i>	0,4	0,5
<i>Sulfametoxazol</i>	3,3	3,8
<i>Sulfadimetoxina</i>	2,1	3,0

Tabela 2.9 - Limite de decisão (CC α) e Capacidade de detecção (CC β)

Composto	CC α (µg/kg)	CC β (µg/kg)
<i>Sulfametazina</i>	100,1	100,2
<i>Sulfamerazina</i>	102,0	104,1
<i>Sulfaclorpiridazina</i>	100,9	101,8
<i>Sulfametoxazol</i>	106,2	112,3
<i>Sulfadimetoxina</i>	104,9	109,8

A seletividade do método pode ser verificada através da injeção de seis amostras de músculo branco (sem adição dos analitos). Comparando os cromatogramas do branco da matriz (Figuras 2.20) e do extrato da matriz fortificada (Figura 2.21) nota-se que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 2.20 – Cromatograma para o branco da matriz (músculo de frango).

Figura 2.21 - Cromatograma para o extrato da matriz (músculo de frango) fortificado no LMR (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

O efeito *carryover* (de memória) pode ocorrer devido a eluição incompleta dos analitos da coluna após a análise cromatográfica ou, até mesmo, contaminações no injetor. O efeito de memória como também é conhecido, resulta em pequenos picos cromatográfico após análise de uma amostra do branco e, portanto, poderá afetar a precisão da metodologia analítica, por isso há necessidade de averiguar se há influência do mesmo no resultado das análises. A análise do extrato branco após a injeção de uma amostra fortificada não apresentou nenhuma ampliação de sinal não apresentando, portanto, efeito de memória.

6 CONCLUSÃO

A viabilidade do SDM-MIP como sorbente para extração seletiva de antimicrobianos da classe das SAs em extratos de músculo de frango foi demonstrada, assim como a aplicabilidade nos dispositivos MEPS.

O efeito de impressão sobre a seletividade do MIPs em relação ao NIP foi confirmada, demonstrando a formação de sítios específicos. Porém, há também formação de sítios não específicos.

As SAs foram extraídas seletivamente empregando pequena quantidade de amostra, além de baixíssimo consumo de solvente orgânico. Sendo assim, a técnica apresenta-se como ambientalmente limpa e, portanto, uma excelente técnica para preparo de amostra e uma alternativa a SPE.

Este estudo demonstrou a aplicabilidade do MIP-MEPS para o preparo de amostras complexas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É sabido que compostos da matriz (interferentes) podem ser retidos no MIPs através de interações não específicas. Assim, como sugestão para minimizar ou eliminar os sítios não específicos, uma alternativa seria utilizar materiais de acesso restrito (RAM) combinado com polímeros molecularmente impressos (MIP), e aplicá-los como adsorvente para uso na MEPS. Assim, poderia aliar a alta seletividade do MIP e a capacidade de exclusão de macromoléculas do RAM numa técnica considerada ambientalmente amigável, permitindo uma maior eficiência nas extrações.

Cabe aqui ressaltar que a obtenção de amostras mais “limpas” promove uma melhora substancial na capacidade de detecção por ultravioleta-visível (UV-Vis) podendo, em muitos casos, ser “dispensado” o uso de equipamentos de detecção mais sofisticados e caros, como é o caso da espectrometria de massas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WIDMER, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 66, 2008.
- [2] BLASCO, C.; DI CORCIA, A.; PICÓ, Y. Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 116, p. 1005, 2009.
- [3] SCHNEIDER, M. J.; MASTOVSK, K.; LEHOTAY, S. J.; LIGHTFIELD, A. R.; KINSELLA, B.; SHULTZ, C. E. Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 290–297, 2009.
- [4] DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S., Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC–ESI–MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 93, 2010.
- [5] LANÇAS, F. M., A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographie**, v. 1, p. 35-61, 2009.
- [6] JINDONG, Q.; HONGYUAN, Y.; HUI, W.; YUNKAI, L. Determination of ofloxacin and lomefloxacin in chicken muscle using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 2668, 2011.
- [7] NICHKOVA, M.; MARCO, M. P. Development and evaluation of C18 and immunosorbent solid-phase extraction methods prior immunochemical analysis of chlorophenols in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 67-82, 2005.
- [8] RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-56, 2007.
- [9] BLOMBERG, L. G. Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 797-807, 2009.
- [10] ABDEL-REHIM, M., New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 317-321, 2004.
- [11] PRIETO, A.; SCHRADER, S.; BAUER, C. M. Synthesis of a molecularly imprinted and its application for microextraction by packed for the determination of fluoroquinolone related compounds in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, p. 146-152, 2011.

[12] SHI, X.; MENG, Y.; LIU, J.; SUN, A.; LI, D.; YAO, C.; LU, Y.; Chen, J. Group-selective molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1071-1076, 2011.

[13] MASQUÉ, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p. 477-486, 2001.

[14] ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II - Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v.39, p 1488-1493, 2004.

[15] ABDEL-REHIM, M.; ANDERSSON, L. I.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L.G. Microextraction in Packed Syringe Online with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Molecularly Imprinted Polymer as Packing Material for MEPS in Selective Extraction of Ropivacaine from Plasma. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 29, p. 1725–1736, 2006.

[16] ABDEL-REHIM, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v.701, p. 119, 2011.

[17] SALAMI, F. H; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 22, p. 1656-1661, 2011.

[18] ADAM, M.; PAVLÍKOVÁ, P.; ČÍŽKOVÁ, A.; BAJEROVÁ, P.; VENTURA, K. Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for L-ascorbic acid determination in beverages. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1613-1618, 2012.

[19] GONÇALVES, J.; MENDES, B.; SILVA, C. L.; CÂMARA, J. S. Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines. **Journal of Chromatography A**, v.1229, p.13-23, 2012.

[20] GONÇALVES, J.; MENDES, B.; SILVA, C. L.; CÂMARA, J. S. A sensitive microextraction by packed sorbent-based methodology combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a powerful technique for analysis of biologically active flavonols in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 739, p 89-98, 2012.

[21] QUINTO, M.; AMODIO, P.; SPADACCINO, G.; CENTONZE, D. Development of a mathematical model for online microextraction by packed sorbent under equilibrium conditions and its application for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in water by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 19-26, 2012.

- [22] ABDEL-REHIM, M.; SKANSEN, P.; VITA, M.; HASSAN, Z.; BLOMBERG, L.; HASSAN, M. Microextraction by packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of olomoucine in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 35-39, 2005.
- [23] TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 87-99, 2010.
- [24] GUIOCHON, G. A.; BEAVER, L. A. Progress and future of instrumental analytical chemistry applied to the environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, p. 1-14, 2004.
- [25] TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de mip (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.
- [26] SELLERGREN, B. **Molecularly imprinted polymers man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2001. v. 23, p. 355-375.
- [27] TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de mip (“molecularly imprinted polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, p. 1087-1101, 2005.
- [28] SAMBE, H.; HOSHINA, K; HOSOYA, K.; HAGINAKA, Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, p. 16-23, 2006.
- [29] PARISI, O. P.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PUOCI, F.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G; PICCI, N. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. **Journal of Polymer Research**, v. 17, p. 355-362, 2010.
- [30] BRUGGERMANN, O.; HAUPT, K.; YE, L.; YILMAZ, E.; MOSBACH, K. New configurations and applications of molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 15-24, 2000.
- [31] SILVA, Raquel. G. C. **Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processos sol-gel**. 2009. 125f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- [32] FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.
- [33] SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. **Química Nova**, v. 32, p. 1609-1619, 2009.

- [34] KOMIYAMA, M.; TAKEUCHI, T.; MUKAWA, T.; ASANUMA, H. **Molecular Imprinting**: From fundamentals to applications. New York: Wiley-VCH, 2003. 147p.
- [35] HE, J.; WANG, S.; FANG, G.; ZHU, H.; ZHANG, Y. Molecularly imprinted polymer online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-UV for the determination of three sulfonamides in pork and chicken. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 2919-2925, 2008.
- [36] BAGGIANI, C.; ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, p. 29-39, 2007.
- [37] TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32-40, 2007.
- [38] SUN, X.; HE, X.; ZHANG, Y.; CHEN, L. Determination of tetracyclines in food samples by molecularly imprinted monolithic column coupling with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 79, p. 926-934, 2009.
- [39] ZHENG, N.; LI, Y. -Z.; WEN, M. -J. Sulfamethoxazole-imprinted polymer for selective determination of sulfamethoxazole in tablets. **Journal of Chromatography A**, v.1033, p. 179-182, 2004.
- [40] SHI, Z.; MENG, Y.; LIU, J.; SUN, A.; LI, D.; YAO, C.; LU, Y.; CHEN, J. Group-selective molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1071-1076.
- [41] ZHENG, N.; FU, Q.; LI, Y. -Z.; CHANG, W. -B.; WANG, Z. -M.; LI, T. -J. Chromatographic characterization of sulfonamide imprinted polymers. **Microchemical Journal**, v. 69, p. 55-60, 2001.
- [42] ZHENG, N.; LI, Y. -Z.; CHANG, W. -B.; WANG, Z. -M.; LI, T. -J. Sulfonamide imprinted polymers using co-functional monomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 452, p. 277-283, 2010.
- [43] XU, W.; SU, S.; JIANG, P.; WANG, H.; DONG, X.; ZHANG, M. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.7198-7207, 2010.
- [44] DAVIES, M. P.; BIASI, V.; PERRETT, D. Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 7-14, 2004.
- [45] VALTCHEV, M.; PALM, B. S.; SCHILLER, M.; STEINFELD, U. Development of sulfamethoxazole-imprinted polymers for the selective extraction from waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 722-728, 2009.

- [46] PRADA, A. G. –V.; MARTÍNEZ-RUIZ, P.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Solid-phase molecularly imprinted on-line preconcentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 125-132, 2005.
- [47] LIU, X.; OUYANG, C.; ZHAO, R.; SHANGGUAN, D.; CHEN, Y.; LIU, Y. Monolithic molecularly imprinted polymer for sulfamethoxazole and molecular recognition properties in aqueous mobile phase. **Analytica Chimica Acta**, v. 571, p. 235-241, 2006.
- [48] PUOCI, F.; IEMMA, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O. P.; SPIZZIRRI, U.G; PICCI, N. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, v. 45, p.1634–1640, 2009.
- [49] COMMISSION DECISION (EC) 657/2002 of 17 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of.

*“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.
Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”*

Walter S. Landor

3

Conclusão Geral

1 Conclusão Geral

O presente trabalho foi dividido em dois diferentes capítulos, onde foram desenvolvidas e aplicadas técnicas de preparo de amostras para análises de antimicrobianos em alimentos.

O capítulo 1 descreveu o desenvolvimento de um método baseado na abordagem QuEChERS para análise de antimicrobianos em músculo de frango e bovino. A aplicação do procedimento proposto provou ser eficiente e bem sucedido na extração de SAs garantindo ótimos resultados para análises de antibióticos em tecido animal. O Método apresentou-se rápido, fácil, barato, eficiente, seguro e robusto de resultados como o próprio nome indica. O método QuEChERS possui muitas vantagens sobre os métodos tradicionais de preparo de amostra, dentre elas podemos citar os altos percentuais de recuperação, além de ser ambientalmente “limpa”.

O capítulo 2 descreveu o estudo da viabilidade do SDM-MIP como sorbente para extração seletiva de antimicrobianos da classe das SAs em amostras biológicas (músculo de frango), assim como sua aplicabilidade nos dispositivos MEPS. O efeito de impressão sobre a seletividade do MIPs foi confirmada, sendo demonstrada por meio dos estudos de recuperação a formação de sítios específicos para a Sulfadimetoxina (molécula molde) e seus análogos estruturais. O uso do MIP como sorbente promove um *clean up* de amostras complexa mais eficiente e, portanto uma melhora substancial na capacidade de detecção por ultravioleta-visível (UV-Vis).

De maneira geral, os métodos desenvolvidos permitiram a análise de medicamentos veterinários em tecido animal, com a vantagem de reduzir o tamanho da amostra e, conseqüentemente, requererem baixo consumo de solvente. Sendo assim, as técnicas apresentaram-se como ambientalmente “limpa” e, portanto, uma excelente técnica para preparo de amostra e uma alternativa a métodos tradicionais com a SPE e LLE.

Este trabalho poderá ser continuado com o desenvolvimento de novos sorbentes molecularmente impressos para uso nos dispositivos MEPS com aplicação em diferentes matrizes.