UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da
química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite
bovino**

Aluna: Adriana Nori de Macedo

Orientadora: Professora Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos, 2012

Adriana Nori de Macedo

Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica e Inorgânica.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Helena e José Maria, e minhas irmãs, Susana e Luciana, por todo o apoio e compreensão de sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades, pela iluminação nas decisões, pela saúde e por todas as condições para conduzir esta pesquisa.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira pela orientação, presença, carinho, confiança e preocupação constante com a nossa formação e aprendizagem.

À Dra. Silvia Brondi por todo o ensinamento que me proporcionou, o qual foi a base para a realização desse trabalho; pelo incentivo e pela confiança de sempre.

A minha família: Helena, José Maria, Susana e Luciana, que sempre estiveram presentes, me apoiando em todos os momentos. Agradeço a vocês a pessoa que sou e todas as coisas que já conquistei na minha vida.

Ao meu namorado, Thiaguinho, por me ouvir, me apoiar e compartilhar ideias, dúvidas e reflexões, seja aqui do meu lado ou do outro lado do mundo.

Aos meus amigos do Laboratório, Luciana, Daniela, Daniele, Gustavo, Raphael, Eliane, Tatiane, Gláucia e Carolina. Obrigada pela presença, ajuda, compreensão, conversas e por todos os momentos juntos.

À Gláucia Marquiti e Carolina Derisso, alunas de iniciação científica cujos projetos co-orientei, pela vontade de aprender e pelo comprometimento que me proporcionaram uma ótima experiência de co-orientação durante o Mestrado.

À Gislei, secretária do grupo, que sempre nos ajuda nas questões burocráticas, com muita eficiência e boa vontade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bessa de Azevedo e seus alunos Ana Fornazari e Rodrigo Padovan, pela ajuda inicial com os planejamentos experimentais.

À Profa. Márcia Nitschke e seus alunos, pelo uso da centrífuga em seu laboratório.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Química de São Carlos e a todos os seus funcionários, professores e alunos que contribuíram de alguma forma.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

A todos os meus amigos, especialmente Anielli, Carla, Marina, Paulo e Priscilla, pela presença e pelo carinho.

RESUMO

A utilização de medicamentos veterinários é de grande importância na produção animal, porém também pode trazer consequências negativas, como a presença de resíduos em alimentos, como o leite bovino. As sulfonamidas são uma classe de antibióticos utilizados no tratamento veterinário e humano, sendo de grande importância sua análise em alimentos de origem animal, como o leite, uma vez que podem provocar resistência bacteriana, reações alérgicas e intoxicações, comprometendo a segurança alimentar da população e prejudicando a fabricação de derivados lácteos. A maioria dos estudos vem utilizando a extração em fase sólida (SPE), na extração das sulfonamidas e no *clean up* da amostra. Entretanto, o método QuEChERS, introduzido em 2003, vem sendo considerado promissor na extração de diversos compostos em matrizes alimentícias. Assim, a presente pesquisa teve o objetivo de desenvolver e validar métodos analíticos, comparando os métodos de extração SPE e QuEChERS, com posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos, para a determinação de sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina) em leite bovino. Na otimização das condições cromatográficas e do método de extração QuEChERS, utilizou-se planejamentos experimentais. Primeiramente, foram otimizadas as condições cromatográficas, selecionando-se coluna C18 Luna (100 x 4,6 mm, 5 μ m), 17 μ L de volume de injeção, comprimento de onda de 290 nm, vazão de 0,50 mL min⁻¹, temperatura de 20 °C e eluição gradiente com os solventes água e etanol. No método de extração QuEChERS, o procedimento otimizado utilizou 6 g de leite, 3 mL de água, 6 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, 2,4 g de MgSO₄ e 0,6 g de acetato de sódio, sendo que na etapa de *clean up* da amostra utilizou-se 37,5 mg de amina primária e secundária, 25 mg de octadecilsilano e 150 mg de MgSO₄. O planejamento experimental foi considerado eficiente na otimização das condições cromatográficas e no procedimento de extração QuEChERS, obtendo-se boa separação entre os picos e valores de recuperação entre 95 e 98%, com desvio padrão relativo inferior a 8,25% para os analitos na concentração de 0,05 mg kg⁻¹. No desenvolvimento do método de extração SPE não foi possível obter boa recuperação dos analitos e *clean up* da amostra. Acredita-se que as sulfonamidas estudadas sejam perdidas na etapa de pré-tratamento do leite, a qual é importante para a realização da SPE. Desse modo, a extração usando o QuEChERS foi selecionada para a análises das sulfonamidas em leite bovino. Os ensaios de validação demonstraram que o método é adequado para a análise das sulfonamidas, dentro do limite máximo de resíduos (0,1 mg kg⁻¹), estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, com exatidão e precisão dentro da faixa aceitável pelos guias de validação seguidos. Além disso, foi possível utilizar apenas etanol e água como fase móvel cromatográfica, o que é uma vantagem em relação a métodos tradicionais, pois utiliza um solvente orgânico menos tóxico e renovável. A vazão de fase móvel é relativamente baixa, o que contribui para a diminuição do volume de solvente orgânico consumido e de resíduos gerados.

ABSTRACT

The use of veterinary medicines is of great importance in animal production, but also can have negative consequences, such as the occurrence of residues in food of animal origin, among which bovine milk stands out. Sulfonamides are an antibiotic class used in animal and human treatments, so it is important to analyze this kind of residue in food of animal origin, such as milk, because it can cause allergic reactions and poisoning, affecting food safety and damaging the manufactory of dairy products. Most of the studies have used solid-phase extraction (SPE) in the extraction of sulfonamides and clean up of the sample. However, the QuEChERS method, introduced in 2003, has been considered promising in the extraction of various compounds in food matrices. Thereby, this research aimed to develop and validate analytical methods comparing the extraction methods SPE and QuEChERS, followed by high performance liquid chromatography with diode array detection for the analysis of sulfonamides (sulfathiazole, sulfamethazine and sulfadimethoxine) in bovine milk. In the optimization of the chromatographic conditions and QuEChERS method, we used experimental design. Chromatographic conditions were optimized, selecting column C18 Luna (100 x 4.6 mm, 5 μ m), injection volume of 17 μ L, wavelength of 290 nm, flow rate of 0.5 mL min⁻¹, temperature of 20 °C and gradient mode, using water and ethanol as mobile phase. In the QuEChERS method, the optimized procedure used 6 g of milk, 3 mL of water, 6 mL of acetonitrile with 1% of acetic acid, 2.4 g of MgSO₄ and 0.6 g of sodium acetate, and in the clean up step it was used 37.5 mg of primary and secondary amine, 25 mg of octadecylsilane and 150 mg of MgSO₄. Experimental design was considered efficient in the optimization, since it was obtained good separation of the chromatographic peaks and recovery between 95 and 98% with relative standard deviation below 8.25% for the analytes in the concentration of 0.050 mg kg⁻¹. In the development of the extraction method SPE, it was not possible to obtain good recovery for the analytes and clean up of the sample. It is believed sulfonamides are lost in the sample pre-treatment step, which is important in performing SPE. Therefore, the QuEChERS method was selected for this analysis. The validation tests demonstrate the method is appropriate, within the maximum limit residue (0.1 mg kg⁻¹), established by the National Health Surveillance Agency, with accuracy and precision within the accepted limit, according to the followed validation guides. Moreover, it was possible to use just water and ethanol as mobile phase, what is an advantage in relation to traditional methods, because it uses an organic solvent less toxicant and renewable. Rate flow is also relatively low, which contributes to decrease the required volume of organic solvent and the amount of waste produced.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Partes de um cartucho de SPE tradicional e esquema das principais etapas de extração.....	24
Figura 2 – Esquema das principais etapas envolvidas na técnica de extração QuEChERS.	28
Figura 3 – Esquema de partes do detector de arranjo de diodos (Adaptado de: User Manual Agilent 1200 Series Diode Array and Multiple Wavelength Detector).	32
Figura 4 – Espectros de absorção das sulfonamidas estudadas.	51
Figura 5 – Gráfico de Pareto dos efeitos calculados no primeiro planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas, considerando as respostas R_S e R_S/t e limites de confiança de 95%.	55
Figura 6 – Cromatograma obtidos utilizando o gradientes 8, selecionado para ser utilizado no presente método cromatográfico.	57
Figura 7 – Gráficos de Pareto dos efeitos calculados para o segundo planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas, considerando as respostas H e A/w, com limite de confiança de 95%.	59
Figura 8 – Cubos de respostas obtidos a partir dos efeitos considerados significativos no planejamento (os melhores vértices estão destacados em vermelho).	61
Figura 9 – Cromatograma dos padrões das sulfonamidas STZ, SMZ e SDM, na concentração de $0,050 \text{ mg L}^{-1}$, nas condições cromatográficas otimizadas: fase móvel composta de etanol e água, gradiente 8, vazão de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 20°C	62
Figura 10 – Curvas analíticas construídas com soluções aquosas dos padrões das sulfonamidas STZ ($0,003$ a $0,500 \text{ mg L}^{-1}$), SMZ ($0,005$ a $0,500 \text{ mg L}^{-1}$) e SDM ($0,010$ a $0,500 \text{ mg L}^{-1}$).	63
Figura 11– Gráficos de resíduos dos analitos STZ, SMZ e SDM, para avaliação das curvas analíticas.....	65
Figura 12 – Cromatogramas de extratos feitos com MeCN e AcEt, com as sulfonamidas na concentração de $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$, comprimentos de onda de 270 e 290 nm	67

Figura 13 – Cromatogramas dos padrões analíticos em diferentes solventes (água, MeCN, EtOH e MeOH), concentração de 0,050 mg L ⁻¹	68
Figura 14 – Cromatograma do extrato QuEChERS, feito com solvente MeCN, após evaporação e reconstituição em água, concentração dos analitos de 0,050 mg kg ⁻¹	69
Figura 15 – Gráficos de Pareto dos contrastes calculados para o primeiro planejamento experimental de otimização do método QuEChERS, considerando os valores de recuperação como respostas e limite de confiança de 95%.....	73
Figura 16 – Gráficos de Pareto dos contrastes calculados para o segundo planejamento experimental de otimização do método QuEChERS, considerando os valores de recuperação como respostas e limite de confiança de 95%.....	75
Figura 17 – Cromatograma do extrato (0,050 mg kg ⁻¹) e do branco da matriz, após extração pelo experimento do ponto central, selecionado como condição otimizada do método QuEChERS.	78
Figura 18 – Cromatogramas dos extratos feitos por SPE, resultantes dos primeiros testes para seleção da fase sólida. Concentração dos analitos de 0,050 mg kg ⁻¹ no leite, correspondente a 0,500 mg kg ⁻¹ para o extrato final.....	81
Figura 19 – Curvas analíticas dos analitos estudados (a parte destacada em verde encontra-se ampliada no gráfico menor).	89
Figura 20 – Gráficos de resíduos dos pontos utilizados na construção da curva analítica.	90
Figura 21 – Cromatogramas de amostras de leite isentas dos analitos (brancos), comparando-os com cromatograma do padrão analítico na concentração LOQ.....	92
Figura 22 – Comparação entre curvas analíticas construídas com extratos, padrão matizado e padrão em solução aquosa, para visualizar a ocorrência de efeito matriz.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Sulfonamidas indicadas para monitoramento pelo PAMVet e PNCRC e estudadas na presente pesquisa.....	19
Tabela 2 – Determinação de sulfonamidas em leite, utilizando SPE e cromatografia líquida (continua).....	26
Tabela 3 – Utilização do método QuEChERS para a extração de sulfonamidas em amostras de leite.	31
Tabela 4 – Matriz de efeitos de um planejamento fatorial completo 2^3	35
Tabela 5 – Programação utilizada na eluição no modo gradiente.....	44
Tabela 6 – Fatores selecionados para avaliação da robustez e experimentos realizados de acordo com o teste de Youden.....	46
Tabela 7 – Níveis selecionados para o primeiro planejamento experimental ($2^4 + 3$) na otimização das condições cromatográficas.	53
Tabela 8 – Matriz de respostas obtidas no primeiro planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas.	54
Tabela 9 – Gradientes testados, onde A é a porcentagem de água na fase móvel e B é a porcentagem de etanol.....	56
Tabela 10 – Respostas de altura (H) e área em relação à largura (A/w), obtidas para os gradientes testados (os melhores resultados estão destacados em vermelho).	57
Tabela 11– Níveis selecionados para o segundo planejamento experimental ($2^3 + 3$), para otimização das condições cromatográficas.	58
Tabela 12 – Matriz de respostas obtidas no segundo planejamento experimental, para otimização das condições cromatográficas.	58
Tabela 13 – Equações das curvas analíticas construídas com os padrões em solução aquosa e parâmetros de avaliação da linearidade.	64
Tabela 14 – LOD e LOQ dos padrões analíticos das sulfonamidas em solução aquosa.	66
Tabela 15 – Níveis selecionados para o primeiro planejamento experimental para otimização do método QuEChERS ($2^{7-3} + 3$).....	70

Tabela 16 – Matriz de respostas obtidas no primeiro planejamento experimental para otimização do método QuEChERS.	71
Tabela 17 – Níveis selecionados para o segundo planejamento experimental, $2^3 + 3$, para otimização do método QuEChERS.	74
Tabela 18 – Matriz de respostas obtidas no segundo planejamento experimental para otimização do método QuEChERS.	74
Tabela 19 – DPR das recuperações obtidas em experimentos com diferentes massas de leite ($n = 3$).	77
Tabela 20– Valores de recuperação e DPR obtidos para novas extrações de experimentos do primeiro planejamento experimental.	77
Tabela 21 – Procedimentos utilizados no primeiro teste de SPE: tipos de fases sólidas contidas nos cartuchos.	80
Tabela 22 – Valores de recuperação obtidos para a extração dos analitos em água, utilizando diferentes fases sólidas.	82
Tabela 23 – Valores de recuperação obtidos para a extração dos analitos em água, utilizando fase sólida C18 de diferentes marcas.	82
Tabela 24 – Valores de recuperação (%) e DPR (%) obtidos utilizando o solvente de eluição AcEt neutro, acidificado e basificado.	83
Tabela 25 – Valores de recuperação (%) e DPR (%) obtidos nos testes de pré-tratamento do leite por acidificação.	85
Tabela 26 – Valores de recuperação (%) e DPR (%) obtidos nos testes de pré-tratamento do leite com sais, acetonitrila e enzimas.	86
Tabela 27 – Diferenças ($D_{(f)}$) e desvio padrão (s_D) calculados para os valores de recuperação e tempos de retenção dos analitos estudados (os valores considerados significativos foram destacados em vermelho).	88
Tabela 28 – Equações, coeficientes de determinação (R^2) e resultados obtidos para o teste F das curvas analíticas.	90
Tabela 29 – Exatidão calculada para os pontos utilizados na construção da curva analítica (o valor destacado em vermelho encontra-se fora do intervalo de aceite).	91

Tabela 30 – Resultados dos testes F e t de Student, para verificação de efeito matriz, sendo $F_{\text{tabelado}} = 19,00$ e $t_{\text{tabelado}} = 2,132$, com 95% de confiança (os valores calculado que foram maiores do que os tabelados estão destacados em vermelho).	95
Tabela 31 – Valores de recuperação (%) calculados utilizando como referência a área do padrão em solução aquosa (Padrão) e do padrão matrizado (Matriz), juntamente com seus valores de DPR (%).	96
Tabela 32 – Valores de exatidão intra-dia e inter-dias (%) calculados para o método analítico.	96
Tabela 33 – Precisão intra-dia e inter-dias (%) calculada para o método analítico.	97
Tabela 34 – Resultados dos testes de estabilidade dos analitos na matriz (os valores fora da faixa de aceite estão destacados em vermelho).	98
Tabela 35 – Resultados dos testes de estabilidade dos analitos em solução aquosa, armazenados em frascos transparentes e âmbar (os valores fora da faixa de aceite estão destacados em vermelho).	99
Tabela 36 – LODs e LOQs obtidos para o método analítico.	99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal.....	16
1.2 Sulfonamidas.....	19
1.3 Métodos de análise de sulfonamidas em leite.....	20
1.3.1 Extração em fase sólida	23
1.3.2 Método de extração QuEChERS.....	28
1.4 HPLC-DAD	31
1.5 Otimização multivariada	33
1.5.1 Planejamentos fatoriais completos	34
1.5.2 Planejamentos fatoriais fracionários.....	35
1.5.3 Planejamentos com pontos centrais.....	36
1.5.4 Utilização de planejamentos experimentais em análises cromatográficas	37
1.6 Química verde	38
1.7 Validação de métodos cromatográficos.....	39
1.8 Justificativa.....	41
2 OBJETIVOS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Reagentes e soluções	42
3.2 Amostras de leite.....	43
3.3 Planejamentos experimentais	43
3.4 Análises cromatográficas	43
3.5 Extração pelo método QuEChERS	44
3.6 Extração pelo método SPE	45
3.7 Validação.....	45
3.7.1 Robustez	46
3.7.2 Curva analítica e linearidade	47
3.7.3 Seletividade.....	47
3.7.4 Recuperação	47
3.7.5 Exatidão	48
3.7.6 Precisão	48

3.7.7 Estabilidade	49
3.7.8 LOD e LOQ	49
3.8 Coleta e análise das amostras de leite.....	50
3.9 Descarte de resíduos gerados	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Otimização das condições cromatográficas	50
4.1.1 Primeiro planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas.....	52
4.1.2 Otimização do gradiente.....	56
4.1.3 Segundo planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas.....	57
4.1.4 Linearidade, LOD e LOQ para os padrões	63
4.2 Desenvolvimento do método de extração QuEChERS	66
4.2.1 Seleção do solvente de extração	66
4.2.2 Primeiro planejamento experimental para otimização do método QuEChERS	69
4.2.3 Segundo planejamento experimental para otimização do método QuEChERS ...	73
4.2.4 Reavaliação dos experimentos do primeiro planejamento	76
4.3 Desenvolvimento do método de extração SPE	79
4.3.1 Seleção da fase sólida	79
4.3.2 Seleção do solvente de eluição.....	83
4.3.3 Seleção do método de pré-tratamento do leite.....	84
4.4 Validação do método QuEChERS-HPLC-DAD	86
4.4.1 Robustez	86
4.4.2 Curva analítica e linearidade	88
4.4.3 Seletividade	92
4.4.4 Recuperação	95
4.4.5 Exatidão	96
4.4.6 Precisão	96
4.4.7 Estabilidade.....	97
4.4.8 LOD e LOQ	99
4.5 Análise das amostras de leite.....	100

5 CONCLUSÕES	100
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	101
REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

A presença de contaminantes microbiológicos e químicos em alimentos é uma das maiores preocupações mundiais em termos de segurança alimentar. Em alimentos de origem animal, tais como o leite, é comum a ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários, destacando-se os antibióticos, os quais são utilizados em tratamentos terapêuticos e profiláticos e como promotores do crescimento (NERO et al., 2007). Diversas pesquisas já detectaram resíduos de antibióticos em amostras de leite no Brasil (BARROS; JESUS; SILVA, 2001; MELLER et al., 1974; NERO et al., 2007) e em outros países (JONES, 2009; LAROCQUE; CARIGNAN; SVED, 1990).

No Brasil, a regulamentação, fiscalização e controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos são de responsabilidade da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Para operacionalizar essa competência, a ANVISA criou o PAMVet (Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal), através da Resolução RDC nº 253 de 16/09/2003 (ANVISA, 2003a), sendo o leite escolhido como primeira matriz de análise, devido ao seu elevado consumo pela população brasileira, especialmente por grupos mais suscetíveis a problemas de saúde, como crianças e idosos. Os princípios ativos selecionados para avaliação pelo PAMVet foram: tetraciclina, beta-lactâmicos, sulfonamidas, abamectina, doramectina e ivermectina, por serem amplamente utilizados na medicina veterinária e por deixarem resíduos em alimentos e oferecerem risco potencial à saúde humana. No relatório do PAMVet, referente aos anos de 2004 e 2005, destacou-se a necessidade da continuidade do programa de monitoramento desses resíduos no leite, além da validação dos métodos preconizados e do desenvolvimento de métodos para análise de sulfonamidas (ANVISA, 2006).

1.1 Resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal

Na produção animal, os antibióticos são utilizados no tratamento terapêutico e profilático de infecções fúngicas e bacteriológicas, combatendo doenças como mastite, disenteria e infecções respiratórias, genitais e oftálmicas. Em doses subterapêuticas, os antibióticos são utilizados como promotores do crescimento, aumentando o peso dos animais, a taxa de reprodução e a eficiência de aproveitamento dos alimentos, e

diminuindo os índices de morbidez e mortalidade (BURG, 1986; DENOBILE; NASCIMENTO, 2004; JONES, 2009; NERO et al., 2007; SILVA; SARMENTO; FRANCA, 2008; WANG et al., 2006). Assim, a utilização dos antibióticos na produção animal resulta em rebanhos mais saudáveis, ganhos econômicos para os produtores, maior disponibilidade de alimentos de origem animal para o consumo humano e menor risco de transferência de infecções dos animais para os seres humanos (HAYS, 1986). Entretanto, quando os antibióticos são utilizados de maneira inadequada (aplicação de medicamentos ilegais, em doses superiores às recomendadas, desrespeito ao período de carência ou adição fraudulenta de antibióticos no leite, para inibir o crescimento bacteriano indesejável), podem oferecer graves riscos à saúde humana e às atividades econômicas (AGARWAL, 1992; BRITO; LANGE, 2005; SILVA; SARMENTO; FRANCA, 2008; WANG et al., 2006; ALTUG, 2002).

Em relação aos riscos à saúde humana, destacam-se os problemas de resistência microbiana, que podem ocorrer tanto no animal quanto no homem. Desde 1977, o FDA (United States Food and Drug Administration) começou a combater a utilização subterapêutica de alguns antibióticos, os quais são também utilizados no tratamento de doenças de seres humanos, pois essa prática pode provocar o desenvolvimento de resistência aos antibióticos por parte de microorganismos patogênicos presentes nos animais, os quais, ao afetarem os seres humanos, resultam em doenças que não podem ser tratadas com o mesmo antibiótico (DENOBILE; NASCIMENTO, 2004; HAYS, 1986; WANG et al., 2006).

Destaca-se que resíduos de antibióticos presentes no leite podem facilmente atingir os consumidores, uma vez que não são eliminados por pasteurização, fervura ou esterilização, provocando além da resistência bacteriana, descrita acima, também reações alérgicas e intoxicações (BRITO; LANGE, 2005; SHAHANI; WHALEN, 1986; SILVA; SARMENTO; FRANCA, 2008). As reações alérgicas, que se manifestam geralmente como dermatites, urticárias, rinites e asma brônquicas, são relacionadas principalmente às penicilinas, mas também podem ser provocadas por tetraciclina, sulfonamidas e estreptomicinas. As intoxicações referem-se principalmente ao potencial carcinogênico de alguns antibióticos, como as sulfonamidas (BRITO; BRITO, 2001; SILVA; SARMENTO; FRANCA, 2008).

A presença de antibióticos no leite também pode comprometer fortemente o processamento tecnológico de derivados lácteos fermentados, como iogurtes, coalhadas e queijos, devido à inibição da flora bacteriana, além de produzir odores desagradáveis em manteigas e cremes de leite, constituindo-se num grave problema econômico para a indústria e os produtores (BRITO; LANGE, 2005; SILVA; SARMENTO; FRANCA, 2008).

Para evitar esses problemas com o conteúdo de resíduos de antibióticos presentes no leite, órgãos reguladores, como o FDA e a ANVISA, estabelecem concentrações máximas toleradas para a segurança humana (DENOBILO; NASCIMENTO, 2004; HAYS, 1986; WANG et al., 2006). No desenvolvimento do PAMVet, a ANVISA (2006) tem considerado os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela Resolução GMC nº 54/2000 (MERCOSUL, 2000), segundo o qual o LMR é de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para o somatório das sulfonamidas presentes em amostras de leite, sendo o mesmo valor estabelecido pela União Europeia (COMMISSION REGULATION EU No 37/2010, 2010).

No PAMVet (ANVISA, 2003b) e no Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite (PNCRC, 2009), as sulfonamidas indicadas para monitoramento são: sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina (Tabela 1).

Tabela 1– Sulfonamidas indicadas para monitoramento pelo PAMVet e PNCRC e estudadas na presente pesquisa.

Nome	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)
Sulfatiazol (STZ)		C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255,32
Sulfametazina (SMZ)		C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,33
Sulfadimetoxina (SDM)		C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310,33

1.2 Sulfonamidas

A ação antimicrobiana das sulfonamidas foi relatada pela primeira vez em meados dos anos de 1930, por Gerhard Domagk, patologista e microbiologista alemão. As sulfonamidas, também chamadas de sulfanilamidas ou sulfas, são substâncias caracterizadas pela presença de grupos R-SO₂-NR'R'', sendo que diferentes grupos R, R' e R'' resultam em diferentes propriedades físicas, químicas e farmacológicas. Quanto às propriedades farmacológicas, as sulfonamidas podem desenvolver atividade antimicrobiana, antiparasitária, antitumoral, antiviral, anticonvulsivante ou analgésica. As sulfonamidas com atividade antimicrobiana apresentam o grupo -SO₂-NR'R'' ligado diretamente a um anel benzênico, o qual contém um grupo amina substituinte na posição *para* (p-NH₂), chamado de N₄. O nitrogênio do grupo sulfonamídico é designado como N₁ e sua ligação com núcleos aromáticos heterocíclicos produz compostos altamente potentes contra bactérias (MITSCHER, 2008; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982).

O grupo SO_2 atua como retirador de elétrons, tornando N_1 relativamente eletropositivo e proporcionando certo caráter ácido ao hidrogênio ligado a N_1 . Essa acidez está relacionada à solubilidade da sulfonamida, bem como aos seus efeitos no organismo, pois quanto menor a acidez do hidrogênio, menor sua solubilidade em água e maior a tendência de acúmulo no organismo (MITSCHER, 2008).

As sulfonamidas são utilizadas, sozinhas ou em ação conjunta com outros compostos, principalmente no tratamento de infecções urinárias, otite, sinusites e pneumonias. São considerados compostos antimicrobianos de amplo espectro, pois combatem diversos tipos de bactérias gram-positivas e gram-negativas, apesar de já haver cepas resistentes, o que tem diminuído sua eficácia nos tratamentos (NOGRADY; WEAVER, 2005).

A inibição bacteriana provocada pelas sulfonamidas ocorre devido a sua intervenção na reação bioquímica de síntese do ácido fólico, essencial para a sobrevivência das bactérias. Essa intervenção ocorre, pois as sulfonamidas são análogos estruturais do ácido p-aminobenzóico (PABA), por apresentarem semelhanças em suas características estéricas e eletrônicas. O PABA é um metabólito essencial para muitas bactérias, pois está envolvido na síntese do ácido fólico, um importante precursor na síntese de ácidos nucleicos. O PABA reage ao entrar em contato com o sítio ativo da enzima diidropteroato sintase, porém, em presença de sulfonamidas, as mesmas podem se ligar aos sítios ativos da enzima, produzindo análogos não funcionais do ácido fólico, o que impede o crescimento bacteriano. Devido a essa ação, as sulfonamidas são chamadas de antimetabólitos ou antagonistas metabólicos (NOGRADY; WEAVER, 2005; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982).

1.3 Métodos de análise de sulfonamidas em leite

O monitoramento de resíduos de antibióticos em alimentos tem sido realizado por métodos microbiológicos e físico-químicos. Os métodos microbiológicos, como os testes inibidores do crescimento bacteriano e ensaios imunológicos e enzimáticos, são os mais utilizados na prática, devido a sua rapidez e baixo custo, porém não podem identificar e quantificar os antibióticos, apenas indicar sua presença ou ausência. Outra desvantagem é que a presença de elevadas quantidades de células somáticas no leite

pode provocar resultados falso-positivos. Além disso, o fato de detectarem resíduos de antibióticos em concentrações bem inferiores aos níveis tolerados pode resultar em descarte desnecessário de lotes inteiros de leite. Assim, esses testes são considerados como testes de triagem, ou seja, aplicados apenas para indicar a possível presença de antibióticos, necessitando do acompanhamento de testes confirmatórios, que apresentem maior sensibilidade e especificidade na identificação e quantificação de resíduos de antibióticos em leite. Os métodos físico-químicos que se mostraram mais adequados a partir dos anos de 1970 e 1980, sendo até hoje os mais utilizados, são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguida pela cromatografia gasosa (GC) e cromatografia em camada delgada (TLC) (AGARWAL, 1992; KANG; JIN; KONDO, 2005; MOATS, 1986; SCHENCK; CALLERY, 1998; SILVA; SARMENTO; FRANCA, 2008).

A cromatografia em camada delgada (TLC) tem aplicação limitada a análises qualitativas de sulfonamidas, podendo ser utilizada, assim como os métodos microbiológicos, como um teste de triagem rápido, necessitando de um posterior método confirmatório (AGARWAL, 1992; ANVISA, 2006).

A cromatografia gasosa (GC), apesar de apresentar boa sensibilidade e especificidade, não é tão frequentemente utilizada na análise de sulfonamidas em leite. Isso decorre do fato de que as sulfonamidas não são facilmente volatilizadas, requerendo que passem por processo de derivatização antes da análise cromatográfica, o que representa maior consumo de reagentes, tempo de preparo de amostra e possibilidade de redução da recuperação dos analitos. Além disso, é necessário realizar uma eficiente etapa de extração do analito e *clean up* da amostra, para obter bons resultados analíticos (AGARWAL, 1992; SAMANIDOU; TOLIKA; PAPADOYANNIS, 2008).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido o método mais amplamente utilizado na análise de resíduos de sulfonamidas em leite. O maior problema encontrado no desenvolvimento da metodologia para a determinação dessas substâncias é a presença de compostos da matriz que possam interferir na análise cromatográfica, o que exige que se realizem etapas de extração do analito e *clean up*

da amostra antes da análise (AGARWAL, 1992; LANÇAS, 2004; SCHENCK; CALLERY, 1998).

Os tipos de detectores mais utilizados na análise de sulfonamidas em leite por HPLC são os espectrofotométricos, entre eles os de arranjo de diodos (DAD), além dos detectores de fluorescência, que podem ser utilizados somente após derivatização das sulfonamidas, e os detectores de espectrometria de massas (AGARWAL, 1992; ZAYAS-BLANCO; GARCÍA-FALCÓN; SIMAL-GÁNDARA, 2004; FELTRIN et al., 2007; ALABURDA et al., 2007; AZOFRA; SARABIA; ORTIZ, 2010). De acordo com as orientações da União Europeia (COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002), métodos analíticos confirmatórios para resíduos orgânicos e contaminantes devem apresentar detecção espectrométrica, permitindo a obtenção de informações estruturais, destacando-se técnicas de detecção como a espectrometria de massas e a espectrofotometria com arranjo de diodos.

Até o final dos anos de 1980, o método mais aplicado para a extração de sulfonamidas em leite foi a extração líquido-líquido (LLE), que se baseia nas diferenças de solubilidade dos componentes da amostra em dois solventes imiscíveis entre si. Alguns solventes utilizados na LLE, além de propiciar a partição líquido-líquido, também provocam a desnaturação das proteínas presentes no leite, resultando em extratos mais limpos e em uma melhor extração das sulfonamidas ligadas às proteínas. Esse método de extração tem a desvantagem de consumir grandes quantidades de solventes orgânicos, ter custo elevado e apresentar geralmente problemas de repetibilidade e reprodutibilidade, devido às várias etapas envolvidas. Assim, nos últimos anos, as pesquisas tendem a buscar outros métodos de extração com mais vantagens analíticas, ambientais e econômicas em comparação com a LLE (AGARWAL, 1992; LANÇAS, 2004).

A partir do início dos anos de 1990, a LLE começou a ser substituída pela extração em fase sólida (SPE), que utiliza menor quantidade de solvente (AGARWAL, 1992). A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido, que se baseia nos princípios de funcionamento da cromatografia líquida clássica. Sua forma mais simples e comum constitui-se numa pequena coluna de prolipropileno, também chamada de cartucho, a qual contém uma fase sólida, escolhida de acordo com o analito e a matriz de estudo. A

amostra é inserida na parte superior do cartucho, percorrendo-o com o auxílio de um pequeno vácuo. Após a fase líquida sair do cartucho, o analito retido na fase sólida é eluído com um pequeno volume de solvente (LANÇAS, 2004). A SPE é o método mais amplamente utilizado na extração e *clean up* de sulfonamidas em leite, após pré-tratamento da amostra para precipitação de proteínas (KINSELLA et al., 2009).

Em 2003, Anastassiades et al. introduziram um método de preparo de amostra descrito como rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), que foi recentemente aplicado na análise de medicamentos veterinários (entre os quais encontram-se algumas sulfonamidas) em leite por Aguilera-Luiz et al. (2008). Este método consiste de duas etapas; a primeira é uma partição líquido-líquido, na qual um solvente orgânico e alguns sais são adicionados à amostra, promovendo a extração dos analitos e a separação das fases (solvente orgânico, fase aquosa e proteínas); na segunda etapa, uma alíquota da fase do solvente orgânico é submetida a uma SPE em cartucho ou dispersiva (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY; MASTOVSKA; YUN, 2005).

1.3.1 Extração em fase sólida

A SPE foi introduzida em meados da década de 1970, tornando-se mais popular do que a LLE, devido a numerosas vantagens em potencial, como: extração mais completa dos analitos, separação mais eficiente entre interferentes e analitos, redução do consumo de solventes orgânicos e da geração de resíduos, menos manipulações da amostra, remoção de partículas maiores e maior facilidade de automação (MAJORS; SLACK, 1997). Assim, vem sendo utilizada na análise de diversos tipos de compostos e amostras, para a pré-concentração dos analitos, extração, *clean up* e estocagem. A Figura 1 apresenta as partes de um cartucho de SPE tradicional e um esquema das principais etapas envolvidas na extração.

Figura 1 - Partes de um cartucho de SPE tradicional e esquema das principais etapas de extração.

O condicionamento tem a função de ativar os sítios ativos da fase sólida, fundamentais para o processo de extração. É importante que, ao final dessa etapa o cartucho não esteja “seco”, ou seja, a fase sólida esteja coberta por uma camada de solvente de cerca de 2 mm. Esse procedimento evita problemas com a reprodutibilidade da extração, pois evita a formação de caminhos preferenciais (LANÇAS, 2004).

A adição da amostra pode ser feita utilizando uma pipeta, micropipeta ou seringa, e o controle do fluxo, através da geração de vácuo na câmara de eluição (*manifold*). O volume de amostra adicionado pode variar de litros a microlitros, dependendo do tipo de amostra, da concentração e retenção do analito e demais compostos da amostra, e da quantidade de fase sólida no cartucho. Em geral, é importante que a aplicação da amostra seja lenta, com vazão inferior a 2 mL min⁻¹, sendo controlada pelo vácuo aplicado ao sistema (MAJORS; SLACK, 1997; LANÇAS, 2004).

A etapa de lavagem promove a remoção de interferentes, e deve ser feita utilizando um solvente que não arraste o analito. A composição e o volume da solução de lavagem são determinados por testes sucessivos, coletando e analisando frações do efluente do cartucho, com o objetivo de selecionar a combinação que resulte na maior

remoção de compostos da matriz e menor perda dos analitos de interesse (MAJORS; SLACK, 1997).

A eluição do analito é efetuada pela lavagem do cartucho com um pequeno volume de solvente, para evitar grande diluição dos analitos. O solvente de eluição deve extrair os analitos de interesse, sem, no entanto, provocar a eluição de compostos da matriz que não tenham sido eliminados na etapa de lavagem (LANÇAS, 2004).

Nas análises de leite, geralmente há também uma etapa de pré-tratamento da amostra, que é feita com o objetivo de separar proteínas e gorduras do leite, as quais podem interferir na extração, ocupando sítios ativos da fase sólida, provocando entupimento do cartucho ou interferindo na posterior análise cromatográfica. Os lipídeos do leite podem ser separados por centrifugação ou pela gravidade, formando uma camada sólida. Os principais métodos para separação da caseína e das proteínas do soro são a precipitação ácida, centrifugação a baixa velocidade com leite suplementado por cálcio, métodos de *salting out*, ultrafiltração, precipitação com solventes orgânicos e coagulação com enzimas (FOX; McSWEENEY, 1998). Os artigos revisados utilizaram precipitação com ácidos: ácido clorídrico (HCl), ácido tricloroacético (TCA) ou ácido trifluoroacético (TFA); ou solventes orgânicos: metanol (MeOH), acetonitrila (MeCN), diclorometano (CH_2Cl_2), acetona ou éter de petróleo, além de agitação e/ou centrifugação, com exceção de Marques et al. (2008) e Feltrin et al. (2007), que adicionaram o leite diretamente ao cartucho de SPE. Algumas pesquisas nas quais a SPE foi utilizada na análise de sulfonamidas em leite são apresentadas na Tabela 2.

Quanto aos cartuchos, alguns trabalhos utilizaram fases sólidas poliméricas (Oasis HLB, Strata X, Lichrolut) e fases poliméricas ligadas a ácido sulfônico (SCX), sendo aplicadas também fases sólidas de sílica, carbono grafitizado (Carbographt I) e octadecilsilano (C18). A maioria dos métodos utilizou solução contendo água e MeOH na etapa de lavagem, em alguns casos utilizando também ácido acético (HAc). Na etapa de eluição, MeOH foi o solvente mais utilizado, sozinho ou em composições com água, hidróxido de amônio (NH_4OH), CH_2Cl_2 ou TFA.

Tabela 2 – Determinação de sulfonamidas em leite, utilizando SPE e cromatografia líquida (continua).

Procedimento de SPE						Método de análise	Referência
Pré-tratamento	Cartucho	Condicionamento	Lavagem	Eluição	Pré-concentração		
20 mL de leite, 20 mL de HCl 1 mol L ⁻¹ , ultrassom	Sep-Pak C18 Plus (Waters)	5 mL de MeOH, 5 mL de H ₂ O	5 mL de H ₂ O com 10% de MeOH, 5 mL de hexano, secagem com N ₂	5 mL de CH ₂ Cl ₂	Evaporação com N ₂ , reconstituição em 500 µL de HCl 1 mol L ⁻¹	HPLC-UV	Zayas-Blanco, García-Falcon e Simal-Gándara (2004)
5 g de leite, 2 mL de TCA 20%, vórtex, 20 mL de tampão Mclvain, vórtex, correção de pH para 4,5 com NaOH	Oasis HLB 500 mg/6 mL (Waters)	5 mL de MeOH, 5 mL de HCl 0,5 mol L ⁻¹ , 5 mL de H ₂ O	5 mL de H ₂ O com 5 % de MeOH, 5 mL de H ₂ O com 5 % de MeOH e 2% de HAc	5 mL de MeOH, 5 mL de H ₂ O com 95% de MeOH e 2% de NH ₄ OH	Rotaevaporação, reconstituição com 1 mL da fase móvel	LC-MS	Koesukkiwat, Jayanta e Leepipatpiboon (2007)
2 mL de leite	Spe-ed C8 500 mg/3 mL (Applied Separations)	6 mL de hexano, 6 mL de MeOH 10 mL de H ₂ O	2 mL hexano	10 mL de MeOH	Secagem com Na ₂ SO ₄ , filtração, rotaevaporação com N ₂ , reconstituição em 1 mL de fase móvel	HPLC-UV	Feltrin et al. (2007)
2 g de leite, 100 µL de TCA 20%, vórtex, 10 mL de tampão Mclvaine pH=4, vórtex, centrifugação, filtração	Oasis HLB 200 mg/6 mL (Waters)	6 mL de MeOH, 6 mL de H ₂ O	6 mL de MeOH com 5 % de H ₂ O, secagem por 10 min	6 mL de MeOH	Evaporação com N ₂ a 40 °C, reconstituição em 1 mL da fase móvel	LC-MS/MS	Bohm, Stachel e Gowik (2009)
5 mL de leite, 3 x 30 mL de CH ₂ Cl ₂ :éter de petróleo (100:3), 10 mL de éter de petróleo	Spe-ed Sílica-gel 500 mg/6 mL (Applied Separations)	não fez	não fez	10 mL de MeOH	Evaporação com N ₂ a 40 °C, reconstituição em 0,9 mL de HAc 1%, derivatização	HPLC- FL	Alaburda et al. (2007)
20 mL de leite, 20 mL de MeCN, agitação, centrifugação, evaporação a 40 °C até reduzir para 5 mL, 100 mL de H ₂ O	LiChrolut EN 200 mg (Merck)	15 mL de MeCN, 20 mL de H ₂ O	2 mL de H ₂ O	10 mL de MeCN	Concentração a 0,5 mL por evaporação, 0,5 mL de H ₂ O	LC-MS	Kim et al. (2003)
10 mL de leite, 100 mL de H ₂ O, agitação	Carbograph 4 500 mg (LARA, Itália)	20 mL de H ₂ O contendo HCl (pH 2), 5 mL de H ₂ O	5 mL de H ₂ O, 20 mL de H ₂ O, secagem por 1 min, 0,5 mL de MeOH	1,5 mL de MeOH, 6 mL de CH ₂ Cl ₂ :MeOH (80:20) com 10 mmol L ⁻¹ de TFA	Evaporação com N ₂ a 40 °C, reconstituição em 300 µL de H ₂ O:MeOH (90:10) com 0,1 mol L ⁻¹ de NaAc	LC-MS	Cavaliere et al. (2003)
leite, TCA 2% (m/m)	Oasis HLB 500 mg/6 mL (Waters)	3 mL de MeOH, 3 mL de TCA 0,5 mol L ⁻¹ , 3 mL de H ₂ O	5 mL de MeOH, 5 mL de H ₂ O com 5% de MeOH e 2% de HAc	5 mL de MeOH, 5 mL de H ₂ O com 95% de MeOH e 2% de NH ₄ OH	Rotaevaporação, reconstituição em tampão pH 3,4, derivatização	HPLC-FL	Azofra, Sarabia e Ortiz (2010)

Tabela 2 - (continuação).

Procedimento de SPE						Método de análise	Referência
Pré-tratamento	Cartucho	Condicionamento	Lavagem	Eluição	Pré-concentração		
5 mL de leite desnatado, 5 mL de tampão K_3PO_4 1 mol L^{-1} pH 4,4	Ciclobond I 3 mL (Astec)	5 mL de H_2O , 5 mL de tampão K_3PO_4	5 mL de tampão K_3PO_4 , 5 mL de água com 20% de tampão K_3PO_4	4 mL de MeOH, passagem por coluna de alumina (condicionada com 5 mL de MeOH), 4 mL de H_2O , tampão e MeOH	Rotaevaporação a $50^\circ C$, reconstituição em 1 mL de MeOH	HPLC-DAD	Agarwal (1993)
10 g de leite, 35 mL CH_2Cl_2 :acetona (65:35), agitação, filtração, nova extração com 35 mL CH_2Cl_2 :acetona (65:35), agitação e filtração, rotaevaporação dos extratos, reconstituição em 10 + 2 x 5 mL de AcEt, secagem com Na_2SO_4	SCX Speedisk 200 mg/6 mL (J. T. Backer)	6 mL de hexano, 8 mL de AcEt	2 mL de MeOH, 5 mL de H_2O , 2 mL de MeOH	5 mL de MeOH: NH_4OH 30% (97:3)	Evaporação com N_2 , reconstituição em 250 μL de H_2O :MeCN (60:40)	HPLC-DAD	Gamba et al. (2009)
2 mL de leite	Bond Elut C18 (Varian)	6 mL de hexano 6 mL de MeOH, 10 mL de H_2O	2 mL de hexano	2 x 5 mL de MeOH	Secagem com Na_2SO_4 , filtração, rotaevaporação, reconstituição em 0,3 mL de HCl 20%, 0,2 mL de $NaNO_2$ 1%, agitação em banho de gelo, 0,5 mL de MeOH com 1% de resorcinol, agitação	HPLC-UV/Vis	Marques et al. (2008)
5 mL de leite, 2,5 mL de MeOH com 30% de TCA, sonicação, centrifugação, extrato transferido para outro frasco e fase sólida re-extraída com 10 mL de tampão McIlvaine pH 4, sonicação, centrifugação	Oasis HLB 200 mg – 6 mL (Waters)	5 mL MeOH, 10 mL MeCN, 5 mL tampão McIlvaine	10 mL de MeOH:MeCN:tampão (6:7,5:86,5)	5 mL de MeOH	Evaporação com N_2 , reconstituição em 500 μL da fase móvel	HPLC-DAD	Mamani, Reyes e Rath (2009)
2 mL de leite, 2 mL de MeCN, agitação, centrifugação, diluição de 2 mL do sobrenadante em 18 mL de H_2O	Strata-X	3 mL de MeOH, 3 mL de H_2O	3 mL de H_2O	3 mL de MeOH	Evaporação com N_2 a $40^\circ C$, reconstituição em 50 μL de MeCN, agitação, 450 μL de H_2O :ácido fórmico (1000:2)	UPLC-ToF-MS	Stolker et al. (2008)

1.3.2 Método de extração QuEChERS

Anastassiades et al. (2003) introduziram um método de preparo de amostra descrito como rápido, fácil, de baixo custo, efetivo, robusto e seguro, denominado QuEChERS, o qual era destinado à análise de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais. No processo de extração, esquematizado na Figura 2, adiciona-se 10 g de amostra, 10 mL de MeCN, 4 g de MgSO_4 e 1 g de NaCl em um tubo de centrífuga. Esta mistura é centrifugada, ocorrendo a partição líquido-líquido entre a água presente na amostra e a MeCN, devido à presença dos sais, que causam o efeito *salting out*. Na segunda etapa do método, retira-se uma alíquota de 1 mL da fase sobrenadante (MeCN), adiciona-se 150 mg de MgSO_4 e 25 mg do adsorvente amina primária e secundária (PSA). A mistura é novamente centrifugada, retirando-se uma alíquota de 0,5 mL da fase líquida, a qual é injetada no sistema cromatográfico. Esta segunda etapa envolve um procedimento chamado SPE dispersiva, que consiste na remoção da água residual e na etapa de *clean-up* da amostra, removendo muitos componentes polares da matriz, como ácidos orgânicos, pigmentos polares, açúcares, etc.

Figura 2 – Esquema das principais etapas envolvidas na técnica de extração QuEChERS.

De acordo com Anastassiades et al. (2003) e Lehotay (2005), algumas das vantagens apresentadas pelo método QuEChERS são: elevados valores de recuperação (superiores a 85%) para pesticidas, numa ampla faixa de polaridades e volatilidades, rapidez de análise (10 a 20 amostras em 30 a 40 minutos), pequeno consumo de solventes, geração de poucos resíduos, utilização de pouco material, robustez e baixo custo dos reagentes envolvidos.

O solvente mais comumente utilizado na técnica de extração QuEChERS é MeCN, porém Anastassiades et al. (2003) apontam acetona e acetato de etila (AcEt) como solventes alternativos. A acetona apresenta a desvantagem de exigir a adição de outro solvente orgânico, além dos sais, para que ocorra a partição de fases com a água, por isso tem sua aplicação bastante limitada. O AcEt tem a vantagem de ser menos miscível em água, porém não resulta em boa extração para analitos mais polares, além de extrair grande quantidade de compostos apolares da matriz, como gorduras. Já a MeCN, não extrai tantos compostos lipofílicos da matriz e permite a partição de fases com a água apenas com a adição de sais, pelo efeito *salting out*.

O sal MgSO_4 foi selecionado devido a sua maior capacidade de absorção de água em relação a outros sais, como LiCl , MgCl_2 , NaCl , NaNO_3 , Na_2SO_4 e frutose, apresentando também a vantagem de liberar calor no processo de hidratação, resultando num aquecimento de 40 a 45 °C, que aumenta a velocidade de extração (ANASTASSIADES et al., 2003). A relação entre a massa de amostra e o volume de solvente também foi estudada por Anastassiades et al. (2003), que perceberam que a maioria dos pesticidas mais polares não foram bem extraídos pelo solvente quando a relação usada foi de 2:1 (10 g de amostra e 5 mL de MeCN). Assim, foi selecionada a relação 1:1 (10 g de amostra e 10 mL de MeCN).

As quantidades de MgSO_4 e NaCl utilizados para induzir a separação de fases interferem na extração dos analitos, uma vez que alteram a quantidade de água presente no solvente extrator. De acordo com os experimentos feitos por Anastassiades et al. (2003), a combinação dos dois sais apresentou bons resultados, porém a adição de maiores quantidades de NaCl , apesar de melhorar a separação das fases, causou diminuição na extração de analitos mais polares.

A SPE dispersiva tem aspectos similares à dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), a diferença é que os adsorventes são adicionados a uma alíquota do extrato, enquanto na MSPD são adicionados à amostra original. Na MSPD, o tamanho da amostra é limitado pelo custo dos adsorventes, geralmente elevado, podendo resultar em problemas de representatividade e homogeneidade da amostra, o que não ocorre na SPE dispersiva, que, além disso, também não necessita de condicionamento da fase sólida, apresentando menor custo e consumo de tempo (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY; MASTOVSKA; YUN, 2005).

O método QuEChERS foi estudado por Lehotay, Mastovska e Yun (2005), que testaram sua aplicação na análise de pesticidas em matrizes alimentícias com maiores conteúdos de gordura, em relação às estudadas anteriormente (frutas e vegetais), tais como leite, ovo, abacate e tecidos animais, obtendo bons resultados de recuperação. Realizaram a etapa de *clean-up* da amostra tanto por SPE dispersiva como por SPE em coluna, concluindo que a SPE dispersiva apresenta diversas vantagens, é mais fácil, barata, rápida, requer menos material e equipamentos, apesar de a SPE em coluna promover um *clean-up* mais efetivo da amostra. Foram testados diversos tipos de adsorventes na SPE dispersiva, concluindo que a combinação de PSA e C18 foi a mais efetiva para o *clean up* das matrizes estudadas.

O sal MgSO_4 é adicionado junto aos adsorventes utilizados na SPE dispersiva para remover a água presente no extrato e promover um melhor *clean up*, pois a remoção de água torna o extrato menos polar e provoca a precipitação de compostos polares co-extraídos da matriz (ANASTASSIADES et al., 2003).

Aguilera-Luiz et al. (2008) utilizaram o método QuEChERS na análise de medicamentos veterinários, entre os quais algumas sulfonamidas (sulfametazina e sulfaquinoxalina) em leite. Esse estudo utilizou na extração apenas a primeira etapa do método QuEChERS, ou seja, a partição líquido-líquido. Para *clean up* da amostra não foi necessária a etapa de SPE dispersiva ou em coluna, apenas uma filtração com filtro de *nylon*. Costa (2010) também utilizou o método QuEChERS para a análise de produtos veterinários, entre os quais algumas sulfonamidas (sulfacetamida, sulfadizina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfaclorpiridazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina) em leite bovino. A Tabela 3

apresenta os procedimentos de extração dos métodos propostos por Aguilera-Luiz et al. (2008) e Costa (2010).

Tabela 3 – Utilização do método QuEChERS para a extração de sulfonamidas em amostras de leite.

Analitos	Procedimento QuEChERS		Método de análise	Referência
	Partição líquido-líquido	Clean up		
Medicamentos veterinários, entre eles SMZ	10 g de leite, 10 mL de MeCN com 1% de HAc, 10 mL de Na ₂ EDTA 0,1 mol L ⁻¹ , vótex por 1 min; 4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaAc, agitação por 1 min, centrifugação a 4500 g por 5 min, coleta de 2 mL do sobrenadante	Filtração em filtro de nylon Millex-GN (0,20 µm), 1 mL foi misturado com 1 mL de MeOH:ácido fórmico 0,01% (50:50)	UPLC-MS/MS	Aguilera-Luiz et al. (2008)
Produtos veterinários, 10 sulfonamidas, entre elas STZ, SMZ e SDM	5 mL de amostra, 5 mL de MeCN com 1% de HAc, 2 g de MgSO ₄ , 1 g de NaAc, vótex por 1 min, centrifugação a 4000 rpm por 5 min, coleta de 1 mL do sobrenadante	25 mg de PSA, 25 mg de C18, 150 mg de MgSO ₄ , vótex por 30 s, centrifugação a 5000 rpm por 5 min, filtração em membrana de fluoropore e em PTFE (0,2 µm), transferência de 0,5 mL para vial	LC-MS/MS	Costa (2010)

1.4 HPLC-DAD

Uma vez que a cromatografia líquida de alta eficiência não é limitada pela volatilidade e estabilidade térmica dos analitos, como é a cromatografia gasosa, quase todas as classes de compostos orgânicos podem ser separadas utilizando essa técnica eficiente e rápida de análise, que utiliza os princípios básicos da cromatografia, descritos por Martin e Synge em 1941 (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência emprega uma fase móvel líquida, que é bombeada por uma bomba de alta pressão e atua como carregador da amostra, fazendo-a percorrer a coluna cromatográfica, a qual é preenchida internamente com uma fase estacionária. A separação ocorre pelas diferentes interações da amostra e com as fases móvel e estacionária, ocorrendo por diversos tipos de mecanismos e resultando em diferentes graus de migração para cada composto. Para identificar e quantificar os compostos separados na cromatografia líquida, diversos tipos de detectores podem ser utilizados, sendo os mais comuns: índice de refração, ultravioleta-

visível (fotômetro, espectrofotômetro e arranjo de diodos), fluorescência, eletroquímico, espectrometria de massas e espalhamento de luz (CASS; DEGANI, 2001; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Os detectores de arranjo de diodos (DAD) baseiam-se na absorção de luz ultravioleta ou visível pelos componentes da amostra, quando submetidos a uma radiação eletromagnética, assim como os fotômetros e espectrofotômetros, também utilizados como detectores em HPLC. Nos DADs, toda a luz da fonte passa pela cela do detector, sendo a luz transmitida dispersa por uma grade holográfica e os comprimentos de onda resultantes focalizado sobre uma série de 256 a 1024 fotodiodos enfileirados (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). A Figura 3 apresenta o esquema do DAD.

Figura 3 – Esquema de partes do detector de arranjo de diodos (Adaptado de: User Manual Agilent 1200 Series Diode Array and Multiple Wavelength Detector).

Algumas vantagens apresentadas pela cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) são (CASS; DEGANI, 2001; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006):

- Obtenção de espectros tridimensionais, apresentando absorbância, comprimento de onda e tempo de retenção;
- Possibilidade de eliminação de picos interferentes pela seleção do comprimento de onda de máxima absorbância para cada analito;
- Possibilidade de obter e armazenar espectros de absorção para cada pico durante a análise cromatográfica, o que constitui um dado adicional para a identificação do analito, por comparação com um padrão ou com uma biblioteca de espectros;
- Detecção simultânea de dois comprimentos de onda, que permite determinar a pureza do pico;
- Redução do desvio da linha de base e do ruído em análises com eluição gradiente, pela subtração dos cromatogramas em dois comprimentos de onda: de absorbância e de referência (no qual nenhum analito apresenta absorbância).

Na análise de sulfonamidas em leite, diversos estudos utilizaram HPLC-DAD como método de análise, tais como Agarwal (1993), Furusawa (2000), Furusawa e Kishida (2001), Gamba et al. (2009) e Mamani, Reyes e Rath (2009).

1.5 Otimização multivariada

O modo mais comum de otimização de condições experimentais é o univariado, no qual se avalia uma variável por vez, enquanto as demais são mantidas constantes. Entretanto, esse modo de otimização indica apenas ótimos locais, além de não identificar interações entre as variáveis. Já a otimização multivariada utiliza planejamentos experimentais, nos quais as variáveis são alteradas simultaneamente, possibilitando a obtenção de ótimos globais e a identificação da influência das interações (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A primeira etapa na construção de um planejamento experimental é determinar os fatores (também chamados de variáveis ou variáveis independentes) e as respostas (ou variáveis dependentes) de interesse no estudo, sendo que ambas podem ser

qualitativas ou quantitativas. A próxima etapa é determinar o tipo de planejamento mais apropriado, que depende do objetivo que se deseja atingir com os experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Para experimentos preliminares, com o objetivo de determinar quais fatores têm influência significativa sobre a resposta, são utilizados planejamentos fatoriais completos em dois níveis (quando o número de fatores é reduzido) ou fatoriais fracionários (quando o número de fatores é muito grande para permitir a realização de um fatorial completo). Caso haja interesse em aprofundar os conhecimentos em relação ao processo, ou construir modelos matemáticos, algumas opções são os planejamentos fatoriais completos em três níveis, matrizes Doehlert ou planejamentos compostos centrais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

1.5.1 Planejamentos fatoriais completos

Planejamentos fatoriais completos de segunda ordem com k fatores têm 2^k experimentos, sendo que cada fator é avaliado em dois níveis, codificados como -1 (nível inferior) e 1 (nível superior). Os efeitos calculados para o planejamento correspondem à influência que cada fator ou combinação de fatores tem sobre a resposta avaliada. A Tabela 4 apresenta a matriz de efeitos de um planejamento com $k = 3$, ou seja, com $2^3 = 8$ experimentos, onde os fatores estudados são x_1 , x_2 e x_3 , e a resposta considerada é y . Os sinais dos efeitos de primeira ordem são iguais aos sinais dos fatores no planejamento. Os sinais dos efeitos de segunda ordem ou de ordens superiores são obtidos pela multiplicação entre os fatores combinados.

Tabela 4 – Matriz de efeitos de um planejamento fatorial completo 2^3 .

Experimentos	Média	Fatores			Interações			Respostas
		x_1	x_2	x_3	x_{12}	x_{13}	x_{123}	
1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	y_1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	y_2
3	1	-1	1	-1	-1	1	1	y_3
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	y_4
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	y_5
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	y_6
7	1	-1	1	1	-1	-1	-1	y_7
8	1	1	1	1	1	1	1	y_8

O cálculo do coeficiente da média ($b_{\text{média}}$) e dos coeficientes dos efeitos (b_i) é feito utilizando as Equações 1 e 2, onde y_i são as respostas obtidas para cada experimento, n é o número de experimentos, $y_{i(+)}$ são as respostas obtidas no nível superior e $y_{i(-)}$ são as respostas obtidas no nível inferior (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

$$b_{\text{média}} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (\text{Equação 1})$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(+)} - \sum_{i=1}^{n/2} y_{i(-)}}{n/2} \quad (\text{Equação 2})$$

1.5.2 Planejamentos fatoriais fracionários

Quando as variáveis envolvidas em um processo são muitas, é inviável executar 2^k experimentos. Para experimentos com $k > 4$, existe pouca probabilidade de efeitos de ordens mais altas serem significativos. Assim, é possível construir um planejamento

fatorial fracionário, inserindo um novo fator no planejamento, o qual ocupa o lugar que seria de um efeito de maior ordem. Esse procedimento acarreta perdas de informações do planejamento, pois os efeitos principais encontram-se confundidos com efeitos de ordens superiores. Nesse caso, os efeitos são chamados de contrastes.

Conforme exemplo dado por Teófilo e Ferreira (2006), considerando um planejamento fracionário 2^{5-1} , no qual o efeito de maior ordem (1234) foi substituído pelo fator 5, temos: $5 = 1234$, relação chamada de gerador. A partir do gerador, obtém-se a geratriz (I), sendo que $I = 12345$. Para encontrar o padrão de confusão dos efeitos, multiplica-se a geratriz por cada um dos efeitos. A regra utilizada nessa multiplicação é que se um mesmo termo aparece mais de uma vez, ele desaparece. Por exemplo, quando o fator 1 é multiplicado pela geratriz 12345, resulta em 2345. Considerando outro exemplo, de um planejamento do tipo 2^{6-2} , em que $5 = 1234$ ($I_1 = 12345$) e $6 = 123$ ($I_2 = 1236$), uma terceira geratriz é resultante da multiplicação de I_1 e I_2 , sendo $I_3 = 456$.

Um conceito presente nos planejamentos fracionários é a “resolução”, que indica o grau em que os efeitos estão confundidos. Geralmente a resolução é igual ao número de termos presentes na geratriz que possui menor número de termos. As resoluções mais comuns são III (efeitos principais não estão confundidos entre si, porém estão confundidos com efeitos de segunda ordem) e IV (efeitos principais não estão confundidos entre si, nem com efeitos de segunda ordem, mas estão confundidos com efeitos de terceira ordem; efeitos de segunda ordem estão confundidos entre si).

1.5.3 Planejamentos com pontos centrais

Para estimar a variância do planejamento sem ter que fazer replicatas de todos os experimentos, uma alternativa utilizada é a inclusão de um ponto central (no qual todas as variáveis estão no nível zero – intermediário aos níveis superior e inferior). Apenas esse experimento central é feito em replicata, e sua variância é assumida para todos os experimentos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Para calcular a estimativa da variância, primeiramente calcula-se a variância (s^2) entre as respostas obtidas para as replicatas do ponto central, utilizando a Equação 3,

onde y_i são as respostas para cada replicata, $\bar{y}$ é a média entre elas e r é o número de replicatas.

$$s^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{r - 1} \quad (\text{Equação 3})$$

Para obter o desvio padrão dos efeitos, s_{efeitos} , utiliza-se a Equação 4.

$$s_{\text{efeitos}} = 2\sqrt{\frac{s^2}{2^k}} \quad (\text{Equação 4})$$

O valor s_{efeitos} permite avaliar a significância dos efeitos calculados, através do teste t de Student, utilizando os valores de t tabelados para determinado número de graus de liberdade ($gl = r - 1$) e nível de confiança (geralmente utiliza-se 95% de confiança). Para que um efeito seja considerado significativo, seu valor em módulo deve ser maior do que o valor da multiplicação $s_{\text{efeitos}} \times t_{gl;95\%}$.

1.5.4 Utilização de planejamentos experimentais em análises cromatográficas

Nos últimos anos vem aumentando o número de trabalhos que utilizam planejamentos experimentais no desenvolvimento de análises cromatográficas, devido às vantagens apresentadas pela otimização multivariada.

Na otimização das condições cromatográficas, alguns artigos que descrevem a utilização de planejamentos experimentais são: Aragão, Veloso e Andrade (2009), Barmapalexis, Kanaze e Georgarakis (2009), Andrade-Eiroa, Diérvate e Dagaute (2010), Dincel e Basci (2007), Harang, Karlsson e Josefson (2001), Iuliani, Carlucci e Marrone (2009), Nemutlu et al. (2009) e Tappin et al. (2008). As interações entre as variáveis cromatográficas podem produzir efeitos em respostas relacionadas à separação, como resolução, número de pratos teóricos, tempo de retenção e altura dos picos cromatográficos. Quando se utiliza planejamento experimental, essas interações podem ser identificadas e avaliadas.

Na otimização do procedimento de preparo de amostras, há diversos artigos que utilizam planejamentos experimentais, por exemplo, em SPE (GIROTTTO et al., 2007; SPANILÁ et al., 2005; AZOFRA; SARABIA; ORTIZ, 2010; FERREIRÓS et al., 2006).

1.6 Química verde

No início da década de 1990, começou a tomar forma uma nova maneira de entender a sustentabilidade e o impacto das atividades químicas no ambiente, que foi chamada de química verde ou química limpa. A química verde é definida como o desenvolvimento e implementação de produtos e processos químicos, para eliminar ou reduzir o uso ou geração de substâncias nocivas ao ambiente e à saúde humana (LENARDÃO et al., 2003).

Basicamente, a química verde procura “prevenir ao invés de remediar”, buscando o uso de matérias-primas recicláveis ou provenientes de fontes renováveis, e maior eficiência no uso da energia, evitando consumo desnecessário, e o uso de substâncias menos persistentes, tóxicas e bioacumulativas (LENARDÃO et al., 2003).

No desenvolvimento de métodos analíticos, um dos critérios que vem sendo considerados é sua adequação aos princípios da química verde. Em métodos cromatográficos, um dos maiores problemas é em relação aos solventes utilizados como fase móvel. Aragão, Veloso e Andrade (2009) propuseram a utilização de etanol, ácido acético e água na composição da fase móvel utilizada para a análise de metilxantinas por HPLC-UV/Vis. Os autores destacam que se trata de um método mais “verde” uma vez que utiliza solventes menos tóxicos ao ambiente e à saúde humana em comparação com outros solventes tradicionalmente utilizados em análises cromatográficas (metanol, acetonitrila, ácido trifluoroacético, etc).

Furusawa (2000) e Furusawa e Kishida (2001) utilizaram etanol na constituição da fase móvel para a análise de sulfonamidas em leite, obtendo boa separação entre os picos cromatográficos dos analitos. Desse modo, considera-se que a utilização de etanol na análise cromatográfica das sulfonamidas poderia ser uma boa opção, pensando em desenvolver um método mais “verde”.

1.7 Validação de métodos cromatográficos

Após o desenvolvimento de um método analítico, deve ser feita sua validação, com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, seguindo critérios estabelecidos por órgãos responsáveis (PASCHOAL et al., 2008). No Brasil, esses órgãos são a ANVISA, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e, em alguns casos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No âmbito internacional, destacam-se a União Europeia, o FDA (United States Food and Drug Administration) e o EPA (Environmental Protection Agency).

No presente estudo, procurou-se abranger os critérios de validação estipulados pela ANVISA (2003c), MAPA (2011), União Europeia (COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002) e FDA (2001). Essa escolha foi baseada no fato de que a ANVISA e o MAPA são os órgãos responsáveis pelos programas PAMVet e PNCRC, respectivamente, os quais estão relacionados aos objetivos do presente estudo. Além disso, a regulação da União Europeia é a mais comumente utilizada no mundo para métodos de análises de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes biológicas. Já o FDA apresenta critérios muito semelhantes aos da ANVISA, de modo que se seguindo um deles, abrange-se o outro.

Os parâmetros a serem avaliados na validação de métodos cromatográficos, de acordo com os guias de validação seguidos são (CASSIANO et al., 2009; PASCHOAL et al., 2008):

- Robustez: avalia o nível de interferência que pequenas variações nas condições experimentais provocam nos resultados;
- Curva analítica: é o modelo matemático que descreve a relação entre a resposta do equipamento (área ou altura do pico cromatográfico) e a concentração do analito. Geralmente utiliza-se o método dos mínimos quadrados, produzindo um modelo linear ou quadrático;
- Linearidade: avalia a adequação da curva analítica aos dados experimentais, através de parâmetros como o coeficiente de determinação, a distribuição dos

resíduos e o desvio entre as respostas experimentais e as respostas previstas pelo modelo;

- Seletividade ou especificidade: visa garantir que o método analítico não responda a compostos provenientes da matriz da mesma forma como os analitos de interesse, evitando assim que haja resultados falso-positivos devido à interferência de tais compostos. Inclui também a investigação do efeito matriz, que ocorre quando substâncias presentes na matriz interferem de alguma forma na análise dos compostos de interesse;
- Recuperação: tem o objetivo de medir a eficiência do processo de extração do método analítico, sendo desejáveis valores próximos a 100%;
- Exatidão: é a concordância entre os resultados obtidos experimentalmente e seus valores nominais, considerados como reais ou verdadeiros;
- Precisão: mede os erros aleatórios resultantes de uma série de análises de uma mesma amostra, sendo expressa em termos do desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR). É dividida em três tipos:
 - Precisão intra-dia ou repetibilidade: compara análises realizadas num curto intervalo de tempo;
 - Precisão inter-dias ou intermediária: compara análises realizadas em diferentes dias;
 - Precisão inter-laboratorial ou reprodutibilidade: compara análises realizadas em diferentes laboratórios. Esse parâmetro não é necessário na validação de métodos que serão utilizados apenas num mesmo laboratório.
- Estabilidade: assegura que o analito não seja degradado quando mantido nas condições de preparo, análise e armazenamento da amostra;
- Limite de detecção (LOD): é a menor concentração do analito que o método diferencia com confiança do ruído;
- Limite de quantificação (LOQ): é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.

O guia de validação da União Europeia (COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002) não abrange os parâmetros LOD e LOQ, mas descreve outros dois parâmetros: o

limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$). O $CC\alpha$ é definido como a menor concentração que permite afirmar a presença do analito com certeza estatística de $1 - \alpha$; e o $CC\beta$ é definido como a menor quantidade do analito que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada com probabilidade de erro β . Para substâncias que possuem LMR definido, $CC\alpha$ e $CC\beta$ são determinados fazendo ensaios com amostras branco fortificadas no LMR e/ou em concentrações próximas ao LMR. Entretanto, no caso das sulfonamidas, o LMR em amostras de leite é expresso como a soma das concentrações de todas as sulfonamidas presentes. Nesse caso, a União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2008) recomenda que seja utilizada uma amostra real, na qual os analitos se encontrem em concentração próxima ao LMR. Como isso não ocorreu nas amostras de leite analisadas, esses parâmetros não foram avaliados na validação do método.

1.8 Justificativa

Diante das considerações apresentadas anteriormente, salienta-se a importância de estudos que busquem procedimentos adequados para o monitoramento de resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal, como o leite. Assim, esse estudo se insere com o propósito de avaliar dois métodos de extração de resíduos de sulfonamidas em leite: a SPE, que vem sendo mais frequentemente utilizada, e o QuEChERS, apenas recentemente aplicado à análise de antibióticos, porém considerado bastante promissor. As sulfonamidas selecionadas para análise (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina) são as que constam nos programas de monitoramento nacionais (ANVISA, 2003b; PNCRC, 2009). Após o desenvolvimento e validação dos métodos, os mesmos serão comparados, para selecionar o mais adequado à análise de resíduos de sulfonamidas em leite, visando atender aos princípios da química verde, a segurança alimentar da população, o comércio e a indústria de laticínios.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos comparar os métodos de extração SPE e QuEChERS na análise cromatográfica de resíduos de sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina) em amostras de leite bovino, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD), validar ambos os métodos e aplicá-los em amostras de leite bovino, procedentes do comércio do município de São Carlos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos sulfatiazol (99,8% de pureza, Fluka), sulfametazina (99,9% de pureza, Riedel-de Haën) e sulfadimetoxina (99,8% de pureza, Fluka) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). As soluções estoque, na concentração de 500 mg L⁻¹, foram preparadas em solvente orgânico etanol, grau HPLC, proveniente da J. T. Baker (Mallinckrodt Baker, USA). As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição das soluções estoque em água isenta de orgânicos (Millipore, Brasil). As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas em refrigerador a 4 °C.

Outros reagentes utilizados no desenvolvimento dos métodos foram: acetonitrila (Tedia Company, USA), metanol (Mallinckrodt Baker, México), acetato de etila (Mallinckrodt Baker, USA), ácido fórmico (Labsynth, Brasil), ácido clorídrico (Qhemis, Brasil), ácido acético (Labsynth, Brasil), ácido sulfúrico (Qhemis, Brasil), hidróxido de amônio (Mallinckrodt Baker, México), sulfato de amônio (Mallinckrodt, França), cloreto de cálcio (AnalytiCals, Itália), PSA (Agilent Technologies, USA), C18 (Agilent Technologies, Reino Unido), sulfato de magnésio anidro (Mallinckrodt Baker, Japão), cloreto de sódio (Mallinckrodt Baker, USA), acetato de sódio (Vetec, Brasil), pepsina (Vetec, Brasil) e quimosina (coagulante líquido Estrella, Chr. Hansen, Brasil).

3.2 Amostras de leite

Na presente pesquisa, para o desenvolvimento dos métodos de extração, utilizaram-se amostras de leite integral *in natura*, provenientes de vacas da raça holandesa que não foram submetidas a tratamento com antibióticos. As amostras foram armazenadas em *freezer*, sob temperatura de -18 °C, sendo descongeladas antes dos procedimentos de extração.

3.3 Planejamentos experimentais

O desenvolvimento dos métodos de análise cromatográfica e de extração foi feito utilizando otimização uni e multivariada, sendo apresentado com maiores detalhes na seção 5 desse relatório. Na presente seção são descritos os métodos finais desenvolvidos.

Para a construção dos planejamentos experimentais e análises estatísticas foram utilizados os programas Statistica 8.0 e Microsoft Office Excel 2007. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória, de acordo com a ordem sorteada pelo programa Statistica 8.0, para evitar a interferência de erros sistemáticos relacionados à ordem de execução.

3.4 Análises cromatográficas

As análises foram feitas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series (USA), com desgaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, amostrador automático ALS G1329A, compartimento da coluna termostatizado G1315A e detector de arranjo de diodos G1315D. Utilizou-se pré-coluna Zorbax SB-C8, 12,5 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Agilent Technologies, USA), e coluna cromatográfica Luna C18(2), 100 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula, 100 Å de tamanho de póro (Phenomenex, USA). O volume de injeção foi de 17 µL, determinado pelo cálculo de 1% do volume da coluna vazia, de acordo com Jardim, Collins e Guimarães (2006), para evitar que a coluna seja sobrecarregada de amostra e favorecer o aproveitamento dos pratos teóricos.

O comprimento de onda selecionado para obtenção dos cromatogramas foi 290 nm. A fase móvel utilizada foi composta por etanol e água, utilizando o modo de eluição gradiente, apresentado na Tabela 5. A vazão foi mantida em 0,50 mL min⁻¹ durante toda a análise, que ocorreu em tempo total de 15 min, e a temperatura da coluna foi fixada em 20 °C.

Tabela 5 – Programação utilizada na eluição no modo gradiente.

Tempo (min)	Água (% v/v)	Etanol (% v/v)
0	100	0
5	80	20
8	60	40
14	30	70
15	100	0

Após a otimização das condições cromatográficas, preparou-se soluções dos padrões analíticos em diferentes concentrações, variando de 0,001 a 0,500 mg L⁻¹, para verificar a linearidade da resposta do equipamento e o LOD e LOQ dos analitos estudados.

3.5 Extração pelo método QuEChERS

Pesou-se 6 g de leite *in natura* em um tubo Falcon de 50 mL, acrescentou-se 240 µL de solução de trabalho das sulfonamidas na concentração de 1,250 mg L⁻¹, resultando na concentração de 0,050 mg kg⁻¹ de cada uma das sulfonamidas no leite. Após agitação, os analitos permaneceram em interação com a matriz por 1 hora e 30 min, antes de prosseguir a extração. Adicionou-se 3 mL de água isenta de orgânicos e 6 mL de MeCN contendo 1% (v/v) de HAc, agitando manualmente por 1 min. Acrescentou-se 2,4 g de MgSO₄ e 0,6 g de acetato de sódio (NaAc), agitando novamente por 1 min. Centrifugou-se a 3500 rpm por 5 minutos, em centrífuga modelo Scientific Legend RT+Easyse (Thermo Fisher). Transferiu-se 1 mL da fase superior

(MeCN) para um tubo *ependorf* de 1,5 mL, contendo 37,5 mg de PSA, 25 mg de C18 e 150 mg de MgSO₄. Agitou-se manualmente por 30 s, centrifugou-se a 6000 rpm por 1 min em centrífuga modelo 5415R (Eppendorf), transferindo-se 0,5 mL da fase líquida para um *vial* do amostrador automático do HPLC, para posterior análise cromatográfica.

3.6 Extração pelo método SPE

Apesar dos diversos procedimentos de extração pelo método SPE que são descritos na literatura para a análise de sulfonamidas em amostras de leite, no presente estudo não foi possível concluir o desenvolvimento desse método de extração, pois foram obtidos apenas baixos valores de recuperação (entre 20 e 30%), frequentemente acompanhados de elevados desvios padrão. Além disso, observou-se a co-eluição parcial de alguns componentes da matriz, que podem interferir nas análises. Inclusive a reprodução de alguns dos métodos descritos na literatura apresentou os mesmos problemas. Os testes feitos com o objetivo de otimizar o método de extração encontram-se descritos na seção 5.3. Nos testes feitos para seleção da fase sólida foram utilizadas as fases sólidas C18 (AccuBond II C18, 500 mg/3 mL, Agilent Technologies e Strata-C18E, 500 mg/3 mL, Phenomenex), polimérica sulfônica de troca iônica (Strata-XC 60 mg/3 mL e 200 mg/3 mL, Phenomenex) e polimérica (OPT, 60 mg/3 mL, Agilent Technologies). Outros equipamentos utilizados foram: centrífuga Excelsa Baby II 206-R (Fanem, Brasil), *manifold* (Macherey-Nagel, Suécia) e bomba de vácuo (Primar, Brasil).

3.7 Validação

Os parâmetros avaliados na validação do método QuEChERS-HPLC-DAD foram: robustez, curva analítica e linearidade, seletividade, recuperação, exatidão, precisão, estabilidade, LOD e LOQ. Os procedimentos seguidos para a avaliação desses parâmetros procuraram abranger os critérios estabelecidos pelos guias de validação da ANVISA (2003c), do MAPA (2011) e da União Europeia (COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002), os quais são descritos a seguir.

3.7.1 Robustez

A robustez foi avaliada introduzindo pequenas variações nas diferentes etapas do procedimento analítico, com o objetivo de investigar o nível de interferência que essas alterações podem provocar nos resultados. Foram incluídos fatores tanto da etapa de extração como da análise cromatográfica. A ANVISA estabelece que a robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método, de modo que foi o primeiro parâmetro de validação a ser estudado. Entretanto, o único guia que estabelece um procedimento específico para o estudo da robustez é o da União Europeia, que recomenda a utilização do teste de Youden.

O teste de Youden consiste em um planejamento experimental fracionário com sete fatores, do tipo 2^{7-4} , resultando em oito experimentos (YOUTEN; STEINER, 1975). A Tabela 6 apresenta os fatores selecionados, bem como seus valores nominais e alternativos e os experimentos feitos. Foram consideradas como respostas a recuperação e o tempo de retenção dos analitos, pois ambos podem ser afetados pelas alterações inseridas no procedimento de extração e nas condições cromatográficas.

Tabela 6 – Fatores selecionados para avaliação da robustez e experimentos realizados de acordo com o teste de Youden.

Fatores	Níveis		Experimentos							
	Nominal (1)	Alternativo (-1)	1	2	3	4	5	6	7	8
Massa de MgSO_4 (g)	2,4	2,45	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
Massa de NaAc (g)	0,6	0,58	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
Fabricante da MeCN	TEDIA	J. T. Backer	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
Massa de PSA (mg)	37,5	38,5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
Massa de C18 (mg)	25	24	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	22	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
Vazão (mL min^{-1})	0,5	0,52	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1

3.7.2 Curva analítica e linearidade

Na construção da curva analítica foram utilizados pelo menos seis níveis de concentração para cada analito, sendo o menor deles o LOQ:

- Sulfatiazol: 0,008; 0,010; 0,020; 0,030; 0,050; 0,100; 0,200 e 0,500 mg kg⁻¹;
- Sulfametazina: 0,013; 0,015; 0,020; 0,030; 0,050; 0,100; 0,200 e 0,500 mg kg⁻¹;
- Sulfadimetoxina: 0,025; 0,030; 0,050; 0,100; 0,200 e 0,500 mg kg⁻¹.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação (R^2), teste F, gráfico de resíduos e exatidão entre as concentrações experimentais e nominais da curva analítica.

3.7.3 Seletividade

Foram analisadas 20 amostras de leite isentas dos analitos, para verificar se ocorreria interferência na região do tempo de retenção dos analitos estudados. Além disso, para avaliar o efeito matriz, foram preparados “padrões matrizados” (termo utilizado pelo guia de validação do MAPA), que são amostras de leite isentas dos analitos (brancos) fortificadas com os padrões analíticos apenas ao final da extração, antes da análise cromatográfica. Os padrões matrizados, em diferentes níveis de concentração, foram comparados com padrões preparados em solução aquosa, procedendo-se os testes estatísticos para verificar se ocorre efeito matriz. De acordo com o MAPA, o estudo do efeito matriz faz parte da avaliação da seletividade do método e tem o objetivo de verificar se ocorrem interferências provocadas por componentes da matriz, as quais provoquem fenômenos de aumento ou diminuição da resposta analítica.

3.7.4 Recuperação

Foram avaliadas amostras fortificadas em quatro níveis de concentração, de acordo com a seguinte descrição:

- LOQ (0,008; 0,013 e 0,025 mg kg⁻¹ para STZ, SMZ e SDM, respectivamente);
- Baixa (CQB): três vezes o LOQ (0,025; 0,040 e 0,075 mg kg⁻¹ para STZ, SMZ e SDM, respectivamente);

- Média (CQM): aproximadamente a média entre a concentração baixa e a alta ($0,220 \text{ mg kg}^{-1}$ para todos os analitos);
- Alta (CQA): entre 75 e 90% da maior concentração da curva analítica ($0,400 \text{ mg kg}^{-1}$ para todos os analitos).

É importante que as concentrações CQB, CQM e CQA não sejam pontos da curva analítica. O cálculo da recuperação foi feito de acordo com a Equação 5.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Área do analito na matriz após extração}}{\text{Área do padrão no analito em solvente}} \times 100\% \quad (\text{Equação 5})$$

3.7.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada em quatro níveis de concentração: LOQ, CQB, CQM e CQA. Cada um dos níveis foi analisado em quintuplicata e esse procedimento foi repetido em mais dois dias diferentes, com o objetivo de avaliar a exatidão intra-dia e inter-dias. O cálculo da exatidão foi feito de acordo com a Equação 6.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração nominal}} \times 100\% \quad (\text{Equação 6})$$

3.7.6 Precisão

Da mesma forma que a exatidão, a precisão foi avaliada utilizando os níveis de concentração LOQ, CQB, CQM e CQA em quintuplicata. Extrações em mais dois dias diferentes também foram feitas para verificar a precisão intra-dia e inter-dias. A precisão foi expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR), de acordo com a Equação 7.

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100\% \quad (\text{Equação 7})$$

3.7.7 Estabilidade

A estabilidade foi verificada para as amostras de leite, fortificadas nas concentrações LOQ, CQB e CQA em triplicata, e para os padrões analíticos, na concentração LOQ. Em ambos os testes, um conjunto de amostras foi analisado logo após o seu preparo, sendo considerado o valor de referência para comparação dos resultados. Os ensaios de estabilidade foram:

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras fortificadas foram submetidas a três ciclos de congelamento (-18 °C) e descongelamento (temperatura ambiente) antes de serem analisadas;
- Estabilidade de curta duração: as amostras fortificadas foram mantidas à temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 20 horas antes de serem analisadas;
- Estabilidade de longa duração: quatro conjuntos de amostras (LOQ, CQB e CQA em triplicata) foram congelados (-18 °C) por 1, 2, 4 e 20 semanas antes de serem analisados;
- Estabilidade pós-processamento: os extratos foram mantidos sob as seguintes condições antes de serem analisados:
 - No injetor automático do HPLC durante 24 horas;
 - Na geladeira (4 °C) durante 1 mês.
- Estabilidade das soluções padrão: soluções dos padrões na concentração LOQ, em frascos transparentes e âmbar, foram mantidas sob as seguintes condições:
 - Em temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 6 horas;
 - Em geladeira (4 °C) por 1, 2 e 15 semanas;
 - Em *freezer* (-18 °C) por 1, 2 e 15 semanas.

3.7.8 LOD e LOQ

O LOD foi considerado como a menor concentração na qual a altura do pico cromatográfico de cada analito foi 3 vezes maior do que a altura média do ruído da linha de base na região do seu tempo de retenção.

O LOQ foi considerado como a menor concentração na qual a altura do pico cromatográfico foi 6 vezes maior do que a altura média do ruído da linha de base na

região do seu tempo de retenção. Além disso, observou-se que essa concentração apresentava valores aceitáveis de precisão ($DPR \leq 20\%$) e exatidão (80 – 120%).

3.8 Coleta e análise das amostras de leite

Foram coletadas 15 amostras de leite procedentes do comércio local da cidade de São Carlos, sendo que procurou-se selecionar leites com diferentes características, como:

- Pasteurizado: tipo A (integral, semidesnatado e desnatado), tipo B (integral) e padronizado (integral);
- UHT (*Ultra High Temperature*): integral, semidesnatado e desnatado.

As amostras de leite pasteurizado foram transportadas para o laboratório em sacola térmica e mantidas em geladeira (4 °C) por no máximo dois dias até o momento da análise.

Juntamente com as extrações das amostras coletadas, foram feitas extrações de amostras de leite inicialmente isentas dos analitos, as quais foram fortificadas nas concentrações LOQ, CQB, CQM e CQA em duplicata. Esses extratos foram analisadas juntamente com as amostras sem fortificação, como forma de controle de qualidade.

3.9 Descarte de resíduos gerados

Os resíduos gerados nas extrações e nas análises cromatográficas foram acondicionados em frascos apropriados e devidamente rotulados, sendo estocados em local ventilado para posterior encaminhamento ao Laboratório de Resíduos Químicos do Instituto de Química de São Carlos, USP, para processamento. Os protocolos de tratamento dos resíduos estão descritos em Alberguini, Silva e Resende (2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições cromatográficas

A Figura 4 apresenta os espectros de absorção das sulfonamidas estudadas. Os comprimentos de onda de maior absorbância para os analitos são 270 nm (para SMZ e

SDM) e 290 nm (para STZ). O comprimento de onda selecionado para monitoramento pelo detector do cromatógrafo foi 290 nm, devido à ocorrência de menor interferência de compostos co-extraídos pelo método QuEChERS conforme é discutido na seção 5.2.

Figura 4 – Espectros de absorção das sulfonamidas estudadas.

Os principais fatores que afetam a resolução, seletividade, sensibilidade e eficiência em HPLC são a composição da fase estacionária, a composição da fase móvel, a vazão e a temperatura.

A fase sólida C18 é a mais freqüentemente utilizada em colunas cromatográficas para análise de sulfonamidas (WANG et al., 2006), de modo que foi a fase sólida de escolha.

Considerando que o presente projeto visa o desenvolvimento de metodologias mais verdes, e que o etanol é um solvente renovável e menos tóxico ao ambiente e aos seres humanos, comparado a outros solventes tradicionalmente utilizados em HPLC (como metanol e acetonitrila), e que esse solvente já foi utilizado por Furusawa (2000) e Furusawa e Kishida (2001) para análise de sulfonamidas, o mesmo foi selecionado

como solvente orgânico constituinte da fase móvel, avaliando-se na otimização apenas sua proporção e a influência da adição de ácido.

A vazão mais usual em HPLC é 1 mL min^{-1} , entretanto há interesse em utilizar vazões menores, devido ao menor consumo de solventes orgânicos, relacionado à geração de menor volume de resíduos, bem como à menor pressão na coluna, o que diminui as chances de ocorrerem vazamentos e danos à fase estacionária. Assim, na otimização foi incluída a vazão convencional (1 mL min^{-1}) e outras menores.

A temperatura é um fator muitas vezes negligenciado em cromatografia de fase reversa, entretanto, pode afetar a eficiência de separação, a pressão e o tempo de retenção dos analitos. Usualmente, temperaturas superiores à ambiente têm sido usadas para aumentar a resolução de compostos de difícil separação, entretanto, em alguns casos, a diminuição da temperatura também pode causar esse efeito, conforme descrito em Andrade-Eiroa, Diérvate e Dagaute (2010). Além disso, apesar de mudanças na composição da fase móvel afetarem muito mais a otimização do que mudanças na temperatura, acredita-se que ambos os fatores apresentem interações, destacando a importância da otimização multivariada.

Assim, os parâmetros selecionados para otimização multivariada foram: proporção de etanol na fase móvel, vazão, temperatura da coluna e proporção de ácido acético na fase móvel.

4.1.1 Primeiro planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas

O primeiro planejamento experimental construído para otimização das condições cromatográficas foi um planejamento fatorial completo 2^4 , com triplicata no ponto central, o que proporciona a avaliação dos parâmetros que têm influência significativa sobre a resposta, através da estimativa da variância do ponto central, sem a necessidade de replicata de todos os experimentos. A Tabela 7 apresenta os níveis selecionados para cada um dos parâmetros.

Tabela 7 – Níveis selecionados para o primeiro planejamento experimental ($2^4 + 3$) na otimização das condições cromatográficas.

Número dos fatores	Fatores	Níveis		
		-1	0	1
1	Vazão (mL min ⁻¹)	0,50	0,75	1,00
2	Temperatura (°C)	20	25	30
3	Etanol (% v/v)	10	25	40
4	Ácido acético (% v/v)	0,00	0,05	0,10

O primeiro objetivo da otimização cromatográfica foi separar os picos dos analitos sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ) e sulfadimetoxina (SDM). A separação entre os picos pode ser avaliada de acordo com a resolução (R_s) entre dois picos consecutivos, sendo que quanto maior o valor de R_s , maior é a separação entre os picos. A resolução é igual à distância entre os centros dos picos divididos por sua largura média, conforme mostrado na Equação 8, onde t_1 e t_2 são os tempos de retenção dos dois picos adjacentes, e w_1 e w_2 são suas larguras ao nível da linha de base (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (\text{Equação 8})$$

Também é importante considerar que o tempo de análise não seja muito elevado. Por isso, foi avaliada também a resposta R_s/t , ou seja, a relação entre a resolução dos picos e o tempo gasto na análise.

As respostas obtidas no primeiro planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas, bem como a ordem de realização dos experimentos, são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz de respostas obtidas no primeiro planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas.

Experimentos	Ordem	Fatores				Respostas			
						Rs		Rs/t	
		1	2	3	4	STZ/SMZ	SMZ/SDM	STZ/SMZ	SMZ/SDM
1	6°	-1	-1	-1	-1	6,71	0,00	0,43	0,00
2	13°	1	-1	-1	-1	4,42	0,00	0,62	0,00
3	8°	-1	1	-1	-1	6,98	0,00	0,53	0,00
4	19°	1	1	-1	-1	4,51	0,00	0,69	0,00
5	1°	-1	-1	1	-1	0,24	1,33	0,10	0,35
6	16°	1	-1	1	-1	0,47	1,66	0,38	0,87
7	11°	-1	1	1	-1	0,49	1,57	0,20	0,45
8	5°	1	1	1	-1	0,22	1,45	0,19	0,83
9	10°	-1	-1	-1	1	5,91	0,00	0,42	0,00
10	17°	1	-1	-1	1	4,77	0,00	0,67	0,00
11	7°	-1	1	-1	1	5,12	0,00	0,37	0,00
12	4°	1	1	-1	1	7,02	0,00	1,10	0,00
13	15°	-1	-1	1	1	0,47	2,16	0,19	0,57
14	9°	1	-1	1	1	0,53	1,68	0,42	0,87
15	2°	-1	1	1	1	0,24	1,32	0,10	0,37
16	18°	1	1	1	1	0,27	1,42	0,23	0,81
17	3°	0	0	0	0	0,86	8,10	0,34	1,06
18	12°	0	0	0	0	3,04	9,91	1,23	1,34
19	14°	0	0	0	0	0,93	8,10	0,37	1,07

Os efeitos de primeira e segunda ordem calculados são apresentados na Figura 5, na forma de gráficos de Pareto. Para verificar quais efeitos foram significativos, foi calculada a estimativa da variância dos efeitos a partir da variância do ponto central, aplicando-se o teste t de Student, considerando o valor de t tabelado para dois graus de liberdade ($n = 3$) e 95% de confiança ($t_{2;95\%} = 2,920$).

Figura 5 – Gráfico de Pareto dos efeitos calculados no primeiro planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas, considerando as respostas R_s e R_s/t e limites de confiança de 95%.

Verificou-se que o único efeito significativo em relação às respostas avaliadas foi a proporção de etanol da fase móvel (b_3), sendo que para a separação entre STZ e SMZ foi melhor o menor nível (10%) e para a separação entre SMZ e SDM foi melhor o maior nível (40%). Isso demonstra a necessidade de utilizar eluição no modo gradiente.

4.1.2 Otimização do gradiente

Por envolver apenas a variação da proporção de etanol na fase móvel, o gradiente foi otimizado de modo univariado. A Tabela 9 apresenta os gradientes testados, fixando a temperatura em 25 °C, a vazão em 0,50 mL min⁻¹ e sem adicionar ácido acético à fase móvel.

Tabela 9 – Gradientes testados, onde A é a porcentagem de água na fase móvel e B é a porcentagem de etanol.

Tempo (min)	Gradiente 1		Gradiente 2		Gradiente 3		Gradiente 4		Gradiente 5		Gradiente 6		Gradiente 7		Gradiente 8	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0	90	10	90	10	90	10	90	10	100	0	100	0	100	0	100	0
5	80	20	80	20	80	20	80	20	80	20	80	20	80	20	80	20
8	60	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60	40
14	60	40	50	50	40	60	30	70	55	45	50	50	40	60	30	70
15	90	10	90	10	90	10	90	10	100	0	100	0	100	0	100	0

Como os picos dos analitos já estavam satisfatoriamente separados em todos os gradientes testados ($R_s > 2$), não havia necessidade de avaliar a resolução entre eles. Por isso, os critérios utilizados para selecionar o melhor gradiente foram: a altura dos picos (H), sendo desejável obter maiores alturas para possibilitar a obtenção de menores limites de detecção e de quantificação; e a relação entre a área dos picos e sua largura na meia altura (A/w), uma vez que, para a quantificação, é desejável obter maiores valores de área, porém sem que ocorra alargamento dos picos. Na Tabela 10 encontram-se os resultados obtidos para os gradientes testados. O gradiente 6 apresentou melhores valores de H para STZ e SMZ, e o gradiente 4, para SDM. Entretanto, o gradiente 8, cujo cromatograma correspondente encontra-se na Figura 6, foi melhor para A/w dos três analitos, com apenas pequena diminuição de H, por isso, foi selecionado como gradiente otimizado.

Tabela 10 – Respostas de altura (H) e área em relação à largura (A/w), obtidas para os gradientes testados (os melhores resultados estão destacados em vermelho).

Analitos	Gradiente 1		Gradiente 2		Gradiente 3		Gradiente 4		Gradiente 5		Gradiente 6		Gradiente 7		Gradiente 8	
	H	A/w	H	A/w	H	A/w	H	A/w	H	A/w	H	A/w	H	A/w	H	A/w
STZ	1,04	69,98	1,06	72,02	1,02	67,68	0,98	67,15	1,37	91,21	1,49	97,71	1,32	86,88	1,44	103,45
SMZ	0,48	32,47	0,49	33,15	0,56	39,06	0,54	36,46	0,61	41,34	0,69	47,04	0,64	43,50	0,66	47,63
SDM	0,38	24,18	0,42	28,19	0,42	28,53	0,47	29,94	0,37	25,01	0,44	28,44	0,44	27,66	0,46	31,15

Figura 6 – Cromatograma obtidos utilizando o gradientes 8, selecionado para ser utilizado no presente método cromatográfico.

4.1.3 Segundo planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas

Como a proporção de etanol foi fixada de acordo com o gradiente otimizado, construiu-se um segundo planejamento experimental, com o objetivo de investigar a influência dos parâmetros: vazão, temperatura da coluna e proporção de ácido acético na fase móvel. A Tabela 11 apresenta os níveis selecionados para cada parâmetro.

Tabela 11– Níveis selecionados para o segundo planejamento experimental ($2^3 + 3$), para otimização das condições cromatográficas.

Número dos fatores	Fatores	Níveis		
		-1	0	1
1	Vazão (mL min ⁻¹)	0,50	0,75	1,00
2	Temperatura (°C)	20	25	30
3	Ácido acético (% v/v)	0,00	0,05	0,10

A Tabela 12 apresenta o planejamento construído, que foi do tipo fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central, juntamente com as respostas obtidas. Assim como na otimização do gradiente, como os picos já estavam satisfatoriamente separados, não havia mais necessidade de avaliar a resolução. Assim, selecionou-se para análise também as respostas: altura dos picos (H), e relação entre a área dos picos e a largura (A/w), sendo os efeitos obtidos apresentados na Figura 7.

Tabela 12 – Matriz de respostas obtidas no segundo planejamento experimental, para otimização das condições cromatográficas.

Experimento	Ordem	Fatores			Respostas					
					STZ		SMZ		SDM	
		1	2	3	H	A/w	H	A/w	H	A/w
1	6°	-1	-1	-1	7,71	677,05	18,11	1305,93	13,32	918,39
2	5°	1	-1	-1	5,26	376,27	7,68	538,81	10,23	693,12
3	10°	-1	1	-1	4,43	304,72	6,19	401,81	12,33	880,41
4	11°	1	1	-1	2,74	187,50	3,37	208,97	7,19	464,25
5	7°	-1	-1	1	4,52	329,88	6,03	405,27	10,37	806,38
6	1°	1	-1	1	3,18	201,86	8,89	631,32	4,66	308,82
7	4°	-1	1	1	4,15	292,75	6,07	428,54	11,35	818,78
8	9°	1	1	1	2,71	190,05	3,42	221,83	7,15	484,60
9	8°	0	0	0	3,38	244,90	4,36	282,49	9,87	722,90
10	3°	0	0	0	3,35	236,73	4,35	293,15	9,53	695,64
11	2°	0	0	0	2,81	191,01	3,44	216,41	7,77	540,46

Figura 7 – Gráficos de Pareto dos efeitos calculados para o segundo planejamento experimental para otimização das condições cromatográficas, considerando as respostas H e A/w, com limite de confiança de 95%.

Para todas as respostas consideradas, a vazão apresentou efeito significativo, sendo melhor o nível inferior ($0,50 \text{ mL min}^{-1}$). A temperatura não teve influência nas respostas da SDM, porém teve efeito significativo negativo nas demais respostas, de modo que foi selecionada a temperatura de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nas separações cromatográficas, há um tempo ideal de contato entre os analitos e as fases estacionária e móvel, para que ocorra uma partição adequada. Esse tempo é influenciado pela movimentação da fase móvel, que depende de alguns fatores, como a vazão e a viscosidade da fase móvel. A diminuição da temperatura aumenta a viscosidade da fase móvel, afetando assim a separação cromatográfica (BRAGA, 2006). Desse modo, é provável que os analitos estudados necessitem do tempo de interação resultante da utilização de uma vazão relativamente baixa ($0,50 \text{ mL min}^{-1}$) e de uma fase móvel com viscosidade aumentada pela diminuição da temperatura.

A proporção de ácido acético também influenciou negativamente as respostas, sendo melhor não adicioná-lo à fase móvel. A adição de ácidos ou bases é indicada para manter os analitos na forma não dissociada ou ionizada, de acordo com o modo de separação utilizado (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). Entretanto, para os analitos desse estudo não houve necessidade de alterar o pH da fase móvel pela adição de ácido.

Para algumas respostas, efeitos de segunda ordem foram positivos, porém menores do que os efeitos negativos de primeira ordem. Além disso, os efeitos de terceira ordem sobre as respostas do SMZ também foram negativos. Desse modo, foram selecionados os níveis negativos dos três fatores avaliados: vazão de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e fase móvel sem ácido acético. A análise dos cubos de resposta (Figura 8), obtidos a partir dos efeitos que foram considerados significativos, também levam à mesma conclusão. Os vértices destacados indicam as melhores respostas previstas, que para STZ e SMZ foram os vértices negativos de todos os fatores, e para SDM foram todos os vértices nos quais a vazão é negativa.

Figura 8 – Cubos de respostas obtidos a partir dos efeitos considerados significativos no planejamento (os melhores vértices estão destacados em vermelho).

Como o presente estudo não objetivou estudos mais aprofundados sobre o comportamento dos analitos no sistema cromatográfico, não havendo interesse em modelagens, e as respostas obtidas com os planejamentos experimentais executados foi satisfatória, optou-se por considerar essas condições como ótimas para o desenvolvimento do método. Na Figura 9 observa-se um cromatograma dos padrões analíticos, obtido nas condições de análise otimizadas.

Figura 9 – Cromatograma dos padrões das sulfonamidas STZ, SMZ e SDM, na concentração de $0,050 \text{ mg L}^{-1}$, nas condições cromatográficas otimizadas: fase móvel composta de etanol e água, gradiente 8, vazão de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 20°C .

4.1.4 Linearidade, LOD e LOQ para os padrões

Em etapa anterior ao desenvolvimento dos métodos de extração, foram analisadas soluções aquosas dos padrões analíticos em diferentes concentrações, em triplicata, para avaliar a linearidade da resposta do equipamento (Figura 10), bem como sua sensibilidade (LOD e LOQ). Para STZ, as concentrações avaliadas variaram de 0,003 a 0,500 mg L⁻¹, com número de níveis m = 10; para SMZ, foram de 0,005 a 0,500 mg L⁻¹, com m = 9; e para SDM, foram de 0,010 a 0,500 mg L⁻¹, com m = 7.

Figura 10 – Curvas analíticas construídas com soluções aquosas dos padrões das sulfonamidas STZ (0,003 a 0,500 mg L⁻¹), SMZ (0,005 a 0,500 mg L⁻¹) e SDM (0,010 a 0,500 mg L⁻¹).

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através de parâmetros obtidos pela análise de variância (ANOVA): coeficiente de determinação (R^2) e relações MQ_R/MQ_r (média quadrática da regressão dividida pela média quadrática dos resíduos) e MQ_{fj}/MQ_{ep} (média quadrática da falta de ajuste dividida pela média quadrática do erro).

puro). Essas duas relações são avaliadas pelo teste F, considerando os graus de liberdade do numerador e do denominador, com 95% de confiança. No teste F, considera-se que há boa adequação da equação aos valores obtidos quando $MQ_R/MQ_r \gg F_{\text{tabelado}}$ e $MQ_{fj}/MQ_{ep} < F_{\text{tabelado}}$ (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1994; ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). A Tabela 13 apresenta os parâmetros de avaliação calculados para os analitos, os quais estão de acordo com os critérios de adequação da equação.

Tabela 13 – Equações das curvas analíticas construídas com os padrões em solução aquosa e parâmetros de avaliação da linearidade.

Parâmetros	Analitos					
	Sulfatiazol		Sulfametazina		Sulfadimetoxina	
	Valores obtidos	F tabelado	Valores obtidos	F tabelado	Valores obtidos	F tabelado
Equação	$y = 171,22x + 0,04$		$y = 203,43x + 1,41$		$y = 130,71x + 0,04$	
R^2	1,0000		0,9998		0,9945	
MQ_R/MQ_r	401784,28	$F_{1;28;95\%} = 4,20$	111675,96	$F_{1;25;95\%} = 4,24$	42152,90	$F_{1;19;95\%} = 4,38$
MQ_{fj}/MQ_{ep}	1,60	$F_{8;20;95\%} = 2,45$	1,23	$F_{7;18;95\%} = 2,58$	0,65	$F_{5;14;95\%} = 2,96$

A linearidade também foi avaliada através dos gráficos de resíduos (Figura 11). Os resíduos de cada nível (d_i) são iguais à diferença entre os valores de área medidos experimentalmente (y_i) e os valores previstos pela equação ($\hat{y}$). Para obter o gráfico de resíduos, os resíduos de cada nível são plotados em função das concentrações. A equação da curva é considerada adequada quando os resíduos estão distribuídos aleatoriamente ao redor da linha dos resíduos “zero” (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1994; ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

Figura 11– Gráficos de resíduos dos analitos STZ, SMZ e SDM, para avaliação das curvas analíticas.

Com a linearidade considerada adequada pelos parâmetros da ANOVA e pelo gráfico de resíduos, é possível verificar que não ocorre falta de ajuste dos modelos, confirmando a adequação do sistema para a quantificação dos analitos.

Os valores de LOD e LOQ obtidos são apresentados na Tabela 14. Foram consideradas como LOD e LOQ as menores concentrações nas quais a altura do pico foi três vezes e seis vezes maior do que altura do ruído da linha de base, respectivamente (MAPA, 2011).

Tabela 14 – LOD e LOQ dos padrões analíticos das sulfonamidas em solução aquosa.

Analitos	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)
STZ	0,001	0,003
SMZ	0,003	0,005
SDM	0,005	0,01

4.2 Desenvolvimento do método de extração QuEChERS

De acordo com Anastassiades et al. (2003), as principais condições a serem otimizadas no desenvolvimento do método QuEChERS são: quantidade de amostra, solvente de extração, sais utilizados no *salting out* e na remoção de água e adsorventes utilizados na etapa de *clean up* da amostra. Em todos os teste, as amostras de leite foram fortificadas na concentração de 0,050 mg kg⁻¹.

4.2.1 Seleção do solvente de extração

Primeiramente, testou-se os solventes de extração MeCN, MeOH, AcEt e EtOH, seguindo a metodologia do método QuEChERS original, proposta por Anastassiades et al. (2003). Nesses testes, que foram feitos em triplicata, pesou-se 10 g de leite num tubo Falcon de 50 mL e adicionou-se 10 mL do solvente orgânico, agitando manualmente por 1 minuto. Acrescentou-se 4 g de MgSO₄ e 1 g NaCl, agitando manualmente por 1 minuto e centrifugando a 5000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se 1 mL da fase do solvente orgânico para um tubo *ependorf* de 1,5 mL, contendo 25 mg de PSA e 150 mg de MgSO₄, agitando manualmente por 30 segundos. Centrifugou-se a 6000 rpm por 1 min, transferindo-se 0,5 mL da fase líquida para um *vial*, para posterior análise cromatográfica.

Verificou-se que, com os solventes MeOH e EtOH, não ocorreu uma adequada separação de fases na primeira etapa do método QuEChERS. Com o solvente MeOH, houve a formação de emulsão com o leite, já com o solvente EtOH não ocorreu separação entre as fases orgânica e aquosa. Assim, apenas os solventes MeCN e AcEt permitiram a obtenção dos extratos finais. Entretanto, as sulfonamidas não foram

detectadas nos extratos feitos em AcEt, apenas nos extratos feitos em MeCN, conforme se observa nos cromatogramas apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Cromatogramas de extratos feitos com MeCN e AcEt, com as sulfonamidas na concentração de $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$, comprimentos de onda de 270 e 290 nm.

No cromatograma do extrato feito com MeCN (Figura 12), observou-se que o pico cromatográfico do analito SMZ, obtido monitorando o comprimento de onda 270 nm, foi encoberto por compostos co-extraídos da matriz. O mesmo não ocorreu quando o comprimento de onda monitorado foi 290 nm, por isso, optou-se por fixá-lo nesse valor nas análises cromatográficas subsequentes.

Os valores de recuperação obtidos foram baixos (26% para STZ; 47% para SMZ e 24% para SDM). Além disso, os picos cromatográficos dos três analitos não apresentaram boa simetria. Considerando que as análises cromatográficas anteriores foram feitas com os padrões solubilizados em água, foi levantada a hipótese de que o fato de as sulfonamidas estarem em MeCN pudesse interferir na eficiência da separação. Para avaliar tal hipótese, foram feitos dois testes:

- 1) Diluiu-se a solução estoque dos analitos em diferentes solventes (água, MeCN, EtOH e MeOH), na concentração de $0,050 \text{ mg L}^{-1}$;
- 2) Preparou-se um novo extrato utilizando MeCN como solvente, porém evaporando-o com fluxo de N_2 e reconstituindo o extrato em água antes na análise cromatográfica.

Os cromatogramas obtidos no primeiro teste são apresentados na Figura 13. Percebeu-se que os picos dos padrões em meio aquoso apresentaram os melhores perfis, ocorrendo picos “partidos” ou com “ombros” no caso dos demais solventes.

Figura 13 – Cromatogramas dos padrões analíticos em diferentes solventes (água, MeCN, EtOH e MeOH), concentração de 0,050 mg L⁻¹.

No segundo teste, obteve-se o cromatograma da Figura 14, que apresentou perfil similar ao do padrão em água, ou seja, obteve-se uma análise cromatográfica mais adequada do que quando o extrato foi analisado em meio de MeCN. Desse modo, optou-se por inserir a etapa de evaporação do solvente MeCN e reconstituição com água ao final da extração QuEChERS.

Figura 14 – Cromatograma do extrato QuEChERS, feito com solvente MeCN, após evaporação e reconstituição em água, concentração dos analitos de 0,050 mg kg⁻¹.

4.2.2 Primeiro planejamento experimental para otimização do método QuEChERS

Após a determinação do solvente mais adequado para a extração dos analitos na matriz leite, construiu-se um planejamento experimental do tipo fatorial fracionário com triplicata no ponto central, $2^{7-3} + 3$, para a verificação dos fatores significativos na extração das sulfonamidas. Os fatores incluídos no planejamento foram: adição de ácido ao solvente de extração, quantidade de amostra, adição de água e quantidades de MgSO₄, NaCl/NaAc, PSA e C18.

A adição de água à amostra tem sido uma estratégia utilizada para facilitar a extração dos analitos em algumas matrizes, como chocolate, manteiga de amendoim, café e cereais (MASTOVSKA; LEHOTAY, 2006) e leite (AGUILERA-LUIZ et al., 2008). E a adição de ácido à fase móvel (HAc), juntamente com a substituição do NaCl por NaAc, resulta na formação do tampão HAc/NaAc, que pode favorecer a extração de alguns analitos (LEHOTAY; MASTOVSKA; YUN, 2005). Os níveis avaliados no planejamento experimental para cada um dos fatores avaliados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Níveis selecionados para o primeiro planejamento experimental para otimização do método QuEChERS ($2^{7-3} + 3$).

Número dos fatores	Fatores	Níveis		
		-1	0	1
1	Solvente	MeCN	MeCN com 1% de HAc	MeCN com 2% de HAc
2	Quantidade amostra (g)	10	6	2
3	Adição de H ₂ O* (mL)	0	5	10
4	MgSO ₄ * (g)	6	4	2
5	NaCl ou NaAc* (g)	1,5	1,0	0,5
6	PSA (mg)	25,0	37,5	50,0
7	C18 (mg)	0	25	50

*Quantidades de H₂O, MgSO₄ e NaCl ou NaAc para 10 g de amostra. Para as demais quantidades de amostra, foram consideradas as devidas proporções. Nos experimentos que usaram apenas MeCN, utilizou-se o sal NaCl, e nos que usaram HAc, utilizou-se NaAc, para formar o tampão HAc/NaAc.

As respostas consideradas na análise do planejamento experimental foram os valores de recuperação, obtidos de acordo com a Equação 5. A recuperação é um parâmetro que compara a concentração de analito presente no leite antes do processo de extração com a concentração no extrato final, sendo utilizada como um indicador da eficiência da extração.

As respostas obtidas para os experimentos encontram-se na Tabela 16 e a seguir são descritos alguns aspectos em relação ao planejamento experimental fracionário utilizado, como sua resolução, relações geratrizes e efeitos confundidos.

Tabela 16 – Matriz de respostas obtidas no primeiro planejamento experimental para otimização do método QuEChERS.

Experimento	Ordem	Fatores							Respostas		
		1	2	3	4	5 (123)	6 (234)	7 (134)	STZ	SMZ	SDM
1	14°	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	87,70	90,56	98,87
2	7°	1	-1	-1	-1	1	-1	1	83,24	90,35	87,77
3	4°	-1	1	-1	-1	1	1	-1	18,37	58,59	21,23
4	6°	1	1	-1	-1	-1	1	1	81,41	91,41	77,50
5	12°	-1	-1	1	-1	1	1	1	0,00	0,00	0,00
6	11°	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0,00	0,00	0,00
7	15°	-1	1	1	-1	-1	-1	1	0,00	0,00	0,00
8	17°	1	1	1	-1	1	-1	-1	0,00	0,00	0,00
9	2°	-1	-1	-1	1	-1	1	1	7,73	43,20	8,10
10	18°	1	-1	-1	1	1	1	-1	70,43	78,73	81,68
11	10°	-1	1	-1	1	1	-1	1	21,63	71,71	24,66
12	3°	1	1	-1	1	-1	-1	-1	70,69	73,09	83,81
13	1°	-1	-1	1	1	1	-1	-1	0,00	0,00	0,00
14	13°	1	-1	1	1	-1	-1	1	89,85	91,70	90,28
15	19°	-1	1	1	1	-1	1	-1	95,90	73,19	45,86
16	5°	1	1	1	1	1	1	1	96,67	78,36	83,20
17	9°	0	0	0	0	0	0	0	93,07	92,27	96,47
18	8°	0	0	0	0	0	0	0	87,10	89,09	98,13
19	16°	0	0	0	0	0	0	0	86,73	89,21	96,64

Considerando que os efeitos confundidos foram 5=123, 6=234 e 7=134, obteve-se as relações geratrizes do planejamento, que foram:

$$I_1=1235$$

$$I_2=2346$$

$$I_3=1347$$

$$I_4=1456$$

$$I_5=2457$$

$$I_6=1267$$

$$I_7=3567$$

A partir do número de termos presentes nas relações geratrizes, determinou-se a resolução do planejamento, que foi IV, o que significa que não há efeitos de primeira ordem confundidos com outros de primeira ordem, nem com efeitos de segunda ordem, porém há efeitos de segunda ordem confundidos entre si.

Utilizando as relações geradoras, foram identificados os efeitos confundidos em cada contraste (ℓ_i) do planejamento fracionário:

$$\begin{aligned}\ell_1 &= 1 + 235 + 12346 + 347 + 456 + 12457 + 267 + 13567 \\ \ell_2 &= 2 + 135 + 346 + 12347 + 12456 + 457 + 167 + 23567 \\ \ell_3 &= 3 + 125 + 246 + 147 + 13456 + 23457 + 12367 + 567 \\ \ell_4 &= 4 + 12345 + 236 + 137 + 156 + 257 + 12467 + 34567 \\ \ell_5 &= 5 + 123 + 23456 + 13457 + 146 + 247 + 12567 + 367 \\ \ell_6 &= 6 + 12356 + 234 + 13467 + 145 + 24567 + 127 + 357 \\ \ell_7 &= 7 + 12357 + 23467 + 134 + 14567 + 245 + 126 + 356 \\ \ell_{12} &= 12 + 35 + 1346 + 2347 + 2456 + 1457 + 67 + 123567 \\ \ell_{13} &= 13 + 25 + 1246 + 47 + 3456 + 123457 + 2367 + 1567 \\ \ell_{14} &= 14 + 2345 + 1236 + 37 + 56 + 1257 + 2467 + 134567 \\ \ell_{15} &= 15 + 23 + 123456 + 3457 + 46 + 1247 + 2567 + 1367 \\ \ell_{16} &= 16 + 2356 + 1234 + 3467 + 45 + 124567 + 27 + 1357 \\ \ell_{17} &= 17 + 2357 + 123467 + 34 + 4567 + 1245 + 26 + 1356 \\ \ell_{24} &= 24 + 1345 + 36 + 1237 + 1256 + 57 + 1467 + 234567 \\ \ell_{124} &= 124 + 345 + 136 + 237 + 256 + 157 + 467 + 1234567\end{aligned}$$

A Figura 15 apresenta os contrastes calculados, considerando como respostas os valores de recuperação. Para os três analitos, as variáveis 1 (solvente) e 4 (MgSO_4) tiveram efeitos positivos, ou seja, foram melhores os níveis superiores (MeCN com 2% de HAc e a maior quantidade de MgSO_4). As variáveis 3 (adição de H_2O) e 5 (NaCl ou NaAc) tiveram efeitos negativos, significando que foram melhores os níveis inferiores (sem adição de H_2O e menores quantidades de NaCl ou NaAc). As variáveis 2 (quantidade de amostra), 6 (PSA) e 7 (C18) apresentaram apenas significâncias pequenas em relação aos demais fatores. Assim, para continuar otimizando as

condições de extração, foram fixadas as variáveis 2, 6 e 7, selecionando-se novos níveis para as demais variáveis, em um segundo planejamento experimental.

Figura 15 – Gráficos de Pareto dos contrastes calculados para o primeiro planejamento experimental de otimização do método QuEChERS, considerando os valores de recuperação como respostas e limite de confiança de 95%.

4.2.3 Segundo planejamento experimental para otimização do método QuEChERS

Com a análise das respostas obtidas no primeiro planejamento experimental, construiu-se um segundo planejamento, excluindo-se as variáveis que não foram consideradas significativas. A quantidade de amostra foi fixada em 2 g, uma vez que é de interesse utilizar uma menor quantidade de amostra; o adsorvente PSA foi fixado na menor massa (25,0 mg), pois teve efeito negativo na recuperação da sulfonamida SDM; e o adsorvente C18 foi fixado na maior massa (50 mg), uma vez que apresentou efeito

positivo para SMZ e SDM. A Tabela 17 apresenta os fatores e níveis selecionados para o segundo planejamento fatorial, que foi do tipo completo com triplicata no ponto central, $2^3 + 3$, e na Tabela 18 encontram-se as respostas obtidas.

Tabela 17 – Níveis selecionados para o segundo planejamento experimental, $2^3 + 3$, para otimização do método QuEChERS.

Número dos fatores	Fatores	Níveis		
		-1	0	1
1	Solvente	1% de HAc	2% de HAc	3% de HAc
2	MgSO ₄ (g)	0,8	1,2	1,6
3	NaAc (g)	0,1	0,2	0,3

Tabela 18 – Matriz de respostas obtidas no segundo planejamento experimental para otimização do método QuEChERS.

Experimentos	Ordem	Fatores			Respostas		
		1	2	3	STZ	SMZ	SDM
1	5°	-1	-1	-1	70,98	64,24	67,44
2	10°	1	-1	-1	79,44	64,33	80,37
3	7°	-1	1	-1	87,75	84,91	82,98
4	11°	1	1	-1	76,39	68,87	80,90
5	2°	-1	-1	1	74,79	64,59	77,29
6	3°	1	-1	1	77,62	92,06	88,69
7	5°	-1	1	1	72,33	69,46	71,91
8	8°	1	1	1	73,29	79,35	82,37
9	1°	0	0	0	72,10	57,02	76,99
10	6°	0	0	0	75,85	69,41	71,40
11	9°	0	0	0	85,67	93,69	86,77

Comparando-se as Tabelas 16 e 18, percebe-se que os valores de recuperação obtidos no segundo planejamento experimental foram piores do que alguns valores obtidos no primeiro planejamento. Além disso, não foram encontrados efeitos significativos, conforme se observa na Figura 16.

Figura 16 – Gráficos de Pareto dos contrastes calculados para o segundo planejamento experimental de otimização do método QuEChERS, considerando os valores de recuperação como respostas e limite de confiança de 95%.

Devido ao resultado obtido no segundo planejamento experimental, percebeu-se que os resultados do primeiro planejamento deveriam ser reavaliados. Na Figura 15 observa-se que contrastes de segunda e terceira ordem tiveram significância maior do que contrastes de primeira ordem. Porém, por ser um planejamento fracionário, não é possível uma adequada interpretação desses contrastes, devido à confusão de efeitos

envolvida. Uma opção no estudo dessas variáveis seria completar o primeiro planejamento, fazendo os experimentos faltantes para torná-lo um fatorial completo, o que proporcionaria a obtenção de efeitos livres de confusão. Entretanto, isso significaria fazer mais 112 experimentos ($2^7 - 16 = 112$), de modo que se trata de uma opção inviável, devido ao grande número de experimentos envolvidos.

Analisando-se a Figura 15, foi possível selecionar os experimentos que apresentaram os melhores resultados de recuperação para os três analitos concomitantemente, que foram os experimentos 1, 14, 17, 18 e 19, sendo os três últimos replicatas do ponto central, ou seja, os melhores experimentos foram 1, 14 e ponto central. Considerando esses experimentos, estabeleceu-se uma nova estratégia para continuar a otimização do método QuEChERS.

4.2.4 Reavaliação dos experimentos do primeiro planejamento

A quantidade de leite (variável 2 do primeiro planejamento) tem pouca probabilidade de provocar alterações na recuperação dos analitos, pois a proporção entre os demais reagentes é mantida nos experimentos. Entretanto, a quantidade de amostra interfere no DPR das amostras, sendo que os erros tendem a aumentar à medida que a quantidade de amostra diminui. Provavelmente esse foi o motivo pelo qual não foram obtidos efeitos significativos no segundo planejamento experimental para otimização do método QuEChERS, no qual se utilizou apenas 2 g de leite. Desse modo, com o objetivo de verificar qual seria a melhor massa de leite a ser utilizada na extração, foram feitos diferentes testes, alterando apenas esse fator, e avaliando os DPRs obtidos. Conforme apresentado na Tabela 19, a massa de leite que resultou em valores de DPR menores do que 5% (porcentagem de erro aceita para o injetor automático do HPLC) para todos os analitos foi 6 g, de modo que optou-se por fixar essa massa de leite para o método de extração QuEChERS.

Tabela 19 – DPR das recuperações obtidas em experimentos com diferentes massas de leite (n = 3).

Massa de leite (g)	DPR (%)		
	STZ	SMZ	SDM
2	9,00	25,42	9,92
3	3,33	4,28	11,91
4	5,50	4,91	9,52
5	4,76	4,75	8,62
6	4,00	2,00	2,00

Foram feitos novamente os experimentos considerados melhores do primeiro planejamento (1, 14 e ponto central), desta vez em duplicata, para avaliar os DPRs e também em branco, para verificar a ocorrência de interferentes co-extraídos da matriz. Os valores de recuperação e DPRs obtidos encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20– Valores de recuperação e DPR obtidos para novas extrações de experimentos do primeiro planejamento experimental.

Analitos	Recuperação ± DPR (%)		
	Experimento 1	Experimento 14	Ponto central
STZ	84,85 ± 20,28	89,28 ± 8,27	94,63 ± 1,48
SMZ	103,14 ± 8,68	61,47 ± 2,68	96,28 ± 0,79
SDM	90,23 ± 12,32	59,22 ± 12,90	97,67 ± 8,25

Verificou-se que os melhores resultados foram encontrados para o experimento do ponto central. Desse modo, considerando que os valores de recuperação e DPR encontrados são satisfatórios com os objetivos da análise, considerou-se as condições do ponto central como as condições otimizadas para a extração das sulfonamidas na matriz leite, utilizando o método QuEChERS. Na Figura 17 encontra-se o cromatograma

de uma extração feita usando o procedimento selecionado, para a amostra acrescida dos analitos (extrato) e isenta dos mesmos (branco), no qual se percebe que não há picos de compostos co-extraídos da matriz interferindo na análise das sulfonamidas.

Figura 17 – Cromatograma do extrato ($0,050 \text{ mg kg}^{-1}$) e do branco da matriz, após extração pelo experimento do ponto central, selecionado como condição otimizada do método QuEChERS.

O método de extração QuEChERS, com as modificações propostas, mostrou-se adequado à análise das sulfonamidas em leite, uma vez que permitiu a recuperação quase completa dos analitos na concentração de $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$, a qual é inferior ao LMR estabelecido pela legislação ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$). Além disso, promoveu um satisfatório *clean up* da amostra, conforme demonstrado pela análise do branco (Figura 17). O solvente extrator utilizado foi MeCN, que é mais tóxico do que AcEt e EtOH, porém não chega a ser tão tóxico quanto solventes clorados e MeOH, frequentemente utilizados em diversos métodos de extração. Além disso, o solvente MeCN é menos volátil, o que representa menor exposição do analista aos vapores durante a extração (ANASTASSIADES et al., 2003). Outro aspecto negativo foi a necessidade de evaporação do solvente extrator para reconstituição do extrato em água, pois envolve mais uma etapa e consome mais tempo, além de requerer a utilização de N_2 . Porém, apesar de algumas desvantagens, associadas à utilização de MeCN e à necessidade

de evaporação, o método desenvolvido pode ser considerado apropriado para a extração dos analitos na matriz leite bovino.

4.3 Desenvolvimento do método de extração SPE

Na otimização do método de extração SPE há um grande número de fatores importantes, como: tipo e quantidade de solventes envolvidos nas etapas de condicionamento da fase sólida, lavagem e eluição, quantidade de amostra, tipo e massa da fase sólida contida no cartucho, taxa de fluxo e procedimento de preparação da amostra antes da adição ao cartucho. Um planejamento experimental com tantos fatores resultaria numa quantidade inviável de experimentos a serem realizados, de modo que é importante haver uma seleção prévia. O primeiro fator a ser selecionado foi o tipo de fase sólida contida no cartucho.

4.3.1 Seleção da fase sólida

Para selecionar o tipo de fase sólida do cartucho, testou-se as fases C18 (AccuBond II C18, 500 mg/3 mL), polimérica sulfônica de troca iônica (Strata-XC 60 mg/3 mL e 200 mg/3 mL) e polimérica (OPT, 60 mg/3 mL).

A etapa de preparo da amostra foi feita de acordo com metodologia proposta pelo fabricante do cartucho Strata-XC (Phenomenex). Transferiu-se 5 g de leite para um tubo Falcon de 15 mL, adicionou-se 200 µL de padrão analítico das sulfonamidas na concentração de 1,25 mg L⁻¹, resultando em 0,050 mg kg⁻¹ nas amostras de leite. Após 1 hora e 30 min de interação entre as amostra e os analitos, adicionou-se 100 µL de ácido fórmico 45% (v/v), agitou-se manualmente e centrifugou-se a 3500 rpm por 20 min. Obteve-se a separação de três fases: uma inferior, contendo as proteínas precipitadas; uma intermediária, contendo o soro do leite; e uma superior, composta por uma camada de gordura. A fase líquida, contendo o soro do leite, com volume de aproximadamente 3 mL, foi coletada para fazer a SPE.

O procedimento de extração utilizado para os cartuchos Strata-XC foi o recomendado pelo fabricante (Phenomenex), que apresenta algumas similaridade ao utilizado por Gamba et al. (2009). Para os cartuchos de C18 e OPT seguiu-se os

procedimentos descritos em Zayas-Blanco, Gracia-Falcón e Simal-Gándara (2004) e Heller et al. (2006), respectivamente, que utilizaram esses tipos de fases sólidas na análise de sulfonamidas em leite. Os procedimentos encontram-se descritos na Tabela 21.

Tabela 21 – Procedimentos utilizados no primeiro teste de SPE: tipos de fases sólidas contidas nos cartuchos.

Etapas	Tipos de fases sólidas			
	C18	Strata-XC 60 mg	Strata-XC 200 mg	OPT
Condicionamento	5 mL MeOH + 5 mL H ₂ O	2 mL MeOH + 2 mL H ₂ O	6 mL MeOH + 6 mL H ₂ O	3 mL MeOH + 3 mL H ₂ O
Lavagem	5 mL MeOH 10%	2 mL HCl 0,1 mol L ⁻¹ + 2 mL MeOH 20%	6 mL HCl 0,1 mol L ⁻¹ + 6 mL MeOH 20%	1 mL H ₂ O
Eluição	2 x 2,5 mL MeOH	2 x 1 mL NH ₄ OH 5% em MeOH	2 x 2,5 mL NH ₄ OH 5% em MeOH	2 x 2,5 mL MeOH

Após a eluição, os extratos foram evaporados em fluxo de N₂ e reconstituídos em 0,5 mL de água. Considerando que, na etapa de pré-tratamento da amostra, os analitos migraram completamente para a fase do soro, e que então houve concentração de 5 mL para 0,5 mL, a concentração dos analitos no extrato final deveria ser dez vezes superior à inicial, ou seja, correspondente a 0,500 mg kg⁻¹, de modo que os extratos obtidos foram comparados com padrões analíticos nessa concentração para o cálculo da recuperação. Os extratos obtidos com a fase OPT apresentaram-se turvos, por isso não foram analisados. A Figura 18 apresenta os cromatogramas dos extratos obtidos com as fases C18 e Strata-XC, nos quais se percebeu que diversos compostos da matriz foram co-extraídos.

Figura 18 – Cromatogramas dos extratos feitos por SPE, resultantes dos primeiros testes para seleção da fase sólida. Concentração dos analitos de $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$ no leite, correspondente a $0,500 \text{ mg kg}^{-1}$ para o extrato final.

O extrato feito com a fase sólida C18 foi o que apresentou menor interferência dos compostos co-extraídos da matriz, porém a recuperação dos analitos foi baixa (19,22; 49,05 e 15,18% para STZ, SMZ e SDM, respectivamente). Com esses resultados, percebeu-se que seria necessário melhorar a etapa de lavagem e de eluição, qualquer que fosse a fase sólida selecionada. Porém, para definir previamente o tipo de fase sólida a ser utilizada, optou-se por excluir a interferência da matriz, de modo a selecionar a melhor fase para os analitos em estudo. Esses testes foram feitos fortificando 5 mL de água ao invés de leite, e procedendo a extração por SPE do mesmo modo como descrito na Tabela 21. Os valores de recuperação obtidos encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 – Valores de recuperação obtidos para a extração dos analitos em água, utilizando diferentes fases sólidas.

Analitos	Recuperação (%)		
	Accu Bond C18	Strata-XC 60 mg	Strata-XC 200 mg
STZ	81,22	72,23	75,40
SMZ	83,31	73,04	75,83
SDM	84,47	73,45	73,54

Considerando que a fase sólida C18 proporcionou melhores valores de recuperação para todos os analitos e que apresentou também os melhores resultados nas extrações utilizando a matriz leite, essa fase foi selecionada para ser utilizada no método de extração SPE. Entretanto, posteriormente foi encontrado um problema: a fabricante dos cartuchos Accu Bond C18 (Agilent Technologies) deixou de produzi-los para inserir uma nova marca de cartuchos, chamada Sampli-Q C18. Durante as primeiras análises com os cartuchos da marca Sampli-Q C18, percebeu-se que a capacidade de extração dos analitos foi muito menor do que a obtida anteriormente com o Accu Bond C18. Como uma alternativa, foram testados cartuchos da marca Strata-C18E (Phenomenex), os quais apresentaram resultados semelhantes aos do Accu Bond C18 (Tabela 23) e, por esse motivo, foram selecionados para a continuação do desenvolvimento do método.

Tabela 23 – Valores de recuperação obtidos para a extração dos analitos em água, utilizando fase sólida C18 de diferentes marcas.

Analitos	Recuperação (%)		
	Accu Bond C18	Strata-C18E	Sampli-Q C18
STZ	81,22	76,94	0,00
SMZ	83,31	78,69	5,27
SDM	84,47	80,52	6,48

4.3.2 Seleção do solvente de eluição

Para selecionar o solvente a ser utilizado na eluição, verificou-se primeiramente os coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{OW}$ ou $\log P$) dos analitos:

- STZ: $\log K_{OW} = 0,97$;
- SMZ: $\log K_{OW} = 0,55$;
- SDM: $\log K_{OW} = 1,26$.

Entre os solventes que apresentam $\log K_{OW}$ próximo a esses valores e são viáveis para utilização na extração, considerando os aspectos práticos e a toxicidade à saúde humana e ao ambiente, foi selecionado o AcEt ($\log K_{OW} = 0,29$). Como o pH pode influenciar nas espécies dos analitos presentes no meio e, desse modo, influenciar em sua extração, foram feitos testes utilizando apenas AcEt, AcEt com 1% de HAc (v/v) e AcEt com 1% de NH_4OH (v/v). Esses testes foram feitos utilizando apenas os analitos em solução aquosa, do mesmo modo como descrito no item 4.3.1, sendo os resultados apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Valores de recuperação (%) e DPR (%) obtidos utilizando o solvente de eluição AcEt neutro, acidificado e basificado.

Analitos	AcEt		AcEt com 1% de HAc		AcEt com 1% de NH_4OH	
	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR
STZ	85,70	11,05	62,96	6,39	75,97	21,93
SMZ	118,86	3,33	90,12	2,79	107,80	22,70
SDM	121,36	16,42	76,84	5,69	98,64	31,44

Apesar de o AcEt puro e AcEt com NH_4OH terem resultado em melhores valores de recuperação (mais próximos da faixa de 80 – 120%), o DPR foi muito alto, pelo menos para um dos analitos. Assim, o AcEt com HAc foi considerado o melhor solvente de eluição, pois apresentou baixos DPRs e recuperações bem próximas da faixa de

aceite, as quais podem ser melhorados posteriormente com um melhor ajuste da porcentagem de HAc ou do volume de solvente utilizado na eluição.

4.3.3 Seleção do método de pré-tratamento do leite

Apesar de haver trabalhos que descrevem a aplicação de amostras de leite diretamente sobre a fase sólida dos cartuchos de SPE (MARQUES et al., 2008; FELTRIN et al., 2007), no presente estudo a realização desse procedimento provocou o entupimento do cartucho, impossibilitando que a continuação da extração. Desse modo, foram avaliados diferentes tipos de métodos de pré-tratamento do leite, para precipitar as proteínas e evitar o entupimento do cartucho.

A primeira técnica testada foi a acidificação, que provoca a precipitação das caseínas, as quais representam cerca de 80% das proteínas do leite bovino. A precipitação ocorre pois as micelas de caseína, normalmente estabilizadas pela repulsão de suas cargas, são neutralizadas em $\text{pH} \approx 4,6$ (ponto isoelétrico), resultando na agregação das partículas (FOX, 2003). A acidificação pode ser feita com diversos tipos de ácidos, sendo que nesse estudo foram testados os ácidos fórmico, acético e sulfúrico. A quantidade de ácido necessária para atingir o ponto isoelétrico das caseínas é variável de amostra para amostra, pois depende da capacidade tamponante do leite. Por esse motivo, foi medido o pH inicial das amostras de leite, acrescentando-se ácido aos poucos, até se obter pH entre 4,5 a 4,9, correspondente à faixa ótima de precipitação da caseína (BYLUND, 1995). Além disso, foi feito um teste fortificando a amostra de leite após a etapa de pré-tratamento, com o objetivo de avaliar as perdas resultantes dessa etapa (Tabela 25).

Tabela 25 – Valores de recuperação (%) e DPR (%) obtidos nos testes de pré-tratamento do leite por acidificação.

Analitos	Tipo de pré-tratamento							
	Ácido acético		Ácido fórmico		Ácido sulfúrico		Ácido fórmico (*)	
	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR
STZ	17,91	33,07	18,00	14,52	15,82	6,64	46,67	0,39
SMZ	23,15	12,23	27,16	9,50	28,22	12,50	63,93	3,51
SDM	16,34	13,94	26,79	10,80	12,96	12,10	85,02	0,99

(*) Amostra fortificada após a etapa de pré-tratamento

O único pré-tratamento com DPR aceitável (<15%) foi o que utilizou ácido fórmico. Entretanto, os valores de recuperação obtidos foram consideravelmente baixos. Observando os valores obtidos no pré-tratamento com ácido fórmico, percebe-se que os resultados foram consideravelmente melhores quando a fortificação foi feita após a etapa de pré-tratamento. Isso significa que provavelmente grande parte dos analitos está sendo perdida juntamente com as proteínas. Por isso, outros tipos de pré-tratamento foram testados, com o objetivo de tentar precipitar as proteínas sem perdas dos analitos (LUCEY; SINGH, 2003):

- Tratamento por *salting out*: podem ser utilizados vários sais, porém o mais comum é o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, na concentração de 260 g L^{-1} , que precipita as caseínas juntamente com algumas proteínas do soro (imunoglobulinas);
- Enriquecimento com cálcio: a adição de CaCl_2 (aproximadamente $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) permite a precipitação das caseínas, as quais podem ser separadas por centrifugação. Aquecendo o leite com CaCl_2 a cerca de 90°C , as proteínas do soro são desnaturadas e precipitam juntamente com a caseína;
- Precipitação por etanol: a adição de aproximadamente 40% de etanol no leite provoca a precipitação das caseínas, enquanto mantém as proteínas do soro solúveis;
- Coagulação enzimática: enzimas como a pepsina e a quimosina promovem a proteólise da caseína em pontos específicos, causando sua precipitação.

Os resultados obtidos com esses testes encontram-se na Tabela 26, na qual se observa de modo geral baixos valores de recuperação e elevados valores de DPR. Desse modo, não foi possível continuar o desenvolvimento do método SPE para a análise das sulfonamidas em leite.

Tabela 26 – Valores de recuperação (%) e DPR (%) obtidos nos testes de pré-tratamento do leite com sais, acetonitrila e enzimas.

Analitos	Tipo de pré-tratamento									
	Sulfato de amônio		Cloreto de cálcio		Etanol		Pepsina		Quimosina	
	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR	Recuperação	DPR
STZ	3,15	40,99	7,59	58,89	1,49	111,73	23,36	3,03	4,22	24,65
SMZ	5,53	19,65	14,74	12,93	0,31	173,21	0,00	0,00	20,48	9,17
SDM	6,65	22,34	9,62	11,06	0,64	173,21	29,61	1,65	15,38	19,99

O baixo desempenho de extração obtido com esse método de extração foi inesperado, considerando o grande número de publicações já existentes. Entretanto, problemas na análise de sulfonamidas por SPE já foram descritos anteriormente por Feltrin et al. (2007), que não conseguiram concluir o desenvolvimento do método para STZ e SMZ.

4.4 Validação do método QuEChERS-HPLC-DAD

4.4.1 Robustez

Os resultados do teste de robustez foram analisados de acordo com a metodologia proposta pela União Europeia (COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002), que consiste basicamente nos cálculos dos efeitos para o planejamento experimental, conforme descrito na Equação 9, onde $D_{(f)}$ é a diferença entre as médias das respostas para os níveis nominal (1) e alternativo (-1) de cada fator f .

$$D_{(f)} = \frac{\sum f_{(1)}}{4} - \frac{\sum f_{(-1)}}{4} \quad (\text{Equação 9})$$

Considera-se que, se um fator tem uma diferença $D_{(f)}$ significativamente maior do que a dos demais fatores, esse fator tem efeito sobre a resposta e essa característica deve ser descrita no procedimento do método. A significância dos efeitos foi avaliada da mesma maneira que nos planejamentos experimentais: através da estimativa da variância de uma extração em triplicada, usando o teste t com 95% de confiança. A extração em triplicata foi feita utilizando todos os fatores em seus níveis nominais. Desse modo, os fatores que apresentaram efeitos com valores em módulo maiores do que $t_{2;95\%} \times s_{\text{efeito}}$ foram considerados significativos.

Outra maneira de avaliar a robustez é através do desvio padrão das diferenças (s_D), de acordo com a Equação 10.

$$s_D = \sqrt{2 \times \sum (D_{(f)}^2 / 7)} \quad (\text{Equação 10})$$

Quando o s_D é significativamente maior do que o desvio padrão do método, calculado nos ensaios de precisão inter-dias, considera-se que todos os fatores juntos têm efeito sobre as respostas, mesmo que os fatores individuais não tenham demonstrado influência no método.

Na Tabela 27 encontram-se os valores de $D_{(f)}$ e s_D calculados considerando como respostas as recuperações e os tempos de retenção dos analitos. Analisando os desvios padrão s_D , observa-se que apenas os valores de recuperação de STZ e SMZ não apresentaram significativas alterações, no entanto, alguns fatores individuais tiveram suas diferenças consideradas significativas. Já para os tempos de retenção verificou-se que os fatores que tiveram maiores efeitos foram as condições cromatográficas (temperatura e vazão), conforme era esperado. Além disso, todos os analitos apresentaram s_D superiores aos obtidos nos ensaios de precisão inter-dias do método (considerando os resultados obtidos para a concentração CQB, a mais próxima da concentração utilizada no teste de robustez), demonstrando que as alterações dos fatores como um todo tiveram influência nos resultados. De modo geral, os únicos fatores que se apresentaram robustos em todas as situações foram as massas de NaAc e PSA. Os demais fatores devem ser mantidos o mais próximo possível de seus valores

nominais, para manter os valores de recuperação e os tempos de retenção dos analitos dentro do esperado.

Tabela 27 – Diferenças ($D_{(f)}$) e desvio padrão (s_D) calculados para os valores de recuperação e tempos de retenção dos analitos estudados (os valores considerados significativos foram destacados em vermelho).

			Respostas					
Fatores		Diferenças e desvio padrão	Recuperação			Tempo de retenção		
			STZ	SMZ	SDM	STZ	SMZ	SDM
A	Massa de MgSO ₄ (g)	$D_{(A)}$	-1,66	-0,10	10,21	-0,05	-0,03	-0,03
B	Massa de NaAc (g)	$D_{(B)}$	-4,05	-1,67	-3,98	-0,01	0,00	0,00
C	Fabricante da MeCN	$D_{(C)}$	6,31	4,12	5,98	-0,03	-0,01	0,00
D	Massa de PSA (mg)	$D_{(D)}$	-4,75	-3,25	-5,56	0,03	0,01	0,00
E	Massa de C18 (mg)	$D_{(E)}$	6,31	5,62	7,59	0,01	0,00	-0,01
F	Temperatura (°C)	$D_{(F)}$	4,08	5,23	12,38	0,09	0,05	0,05
G	Vazão (mL min ⁻¹)	$D_{(G)}$	5,75	3,20	19,30	0,13	0,17	0,13
		$t_{2;95\%} \times s_{\text{efeito}}$	5,62	4,30	5,87	0,03	0,01	0,02
		s_D	6,99	5,33	14,83	0,09	0,10	0,08
		$s_{\text{precisão}} (*)$	9,65	5,49	6,84	0,04	0,03	0,03

(*) Desvio padrão referente aos testes de precisão inter-dias na concentração CQB

4.4.2 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas obtidas para os analitos são apresentadas na Figura 19, na qual os menores níveis de concentração foram ampliados para permitir uma melhor visualização.

Figura 19 – Curvas analíticas dos analitos estudados (a parte destacada em verde encontra-se ampliada no gráfico menor).

Na Tabela 28 encontram-se as equações das retas e os valores de R^2 e teste F das curvas analíticas construídas. Os valores de R^2 estão dentro das faixas de aceite, sendo todos maiores do que 0,98. O teste F foi feito do mesmo modo como descrito no item 4.1.4, sendo que todos os valores indicam uma boa adequação das equações aos dados experimentais.

Tabela 28 – Equações, coeficientes de determinação (R^2) e resultados obtidos para o teste F das curvas analíticas.

Parâmetros	Analitos					
	STZ		SMZ		SDM	
	Valores obtidos	F tabelado	Valores obtidos	F tabelado	Valores obtidos	F tabelado
Equação	$y = 181,191x + 0,257$		$y = 87,845x + 0,429$		$y = 83,018x - 0,297$	
R^2	0,9980		0,9992		0,9996	
F_{MQ_R/MQ_r}	10815,09	$F_{1;22;95\%} = 5,79$	27269,01	$F_{1;19;95\%} = 5,922$	41492,18	$F_{1;16;95\%} = 6,12$
$F_{MQ_{fj}/MQ_{ep}}$	0,15	$F_{6;16;95\%} = 3,34$	0,78	$F_{5;14;95\%} = 3,66$	0,78	$F_{4;12;95\%} = 4,12$

A linearidade também foi avaliada utilizando os gráficos de resíduos (Figura 19), verificando-se uma distribuição aleatória dos resíduos, o que colabora para a conclusão de que o modelo proposto é adequado aos dados experimentais.

Figura 20 – Gráficos de resíduos dos pontos utilizados na construção da curva analítica.

A ANVISA (2003c) estabelece mais um critério para análise da curva analítica, que é a exatidão dos pontos utilizados em sua construção. A exatidão é considerada como a porcentagem da concentração experimental, calculada para cada ponto utilizando a equação da curva analítica, em relação à concentração nominal desse ponto. De acordo com a ANVISA, a exatidão dos pontos da curva deve estar entre 80 e 120% no LOQ e entre 85 e 115% nas demais concentrações, sendo que dois de cada seis pontos podem estar fora desses critérios, excetuando-se o LOQ e o ponto correspondente à maior concentração da curva. A Tabela 29 apresenta os valores de exatidão calculados para cada ponto, observando-se que apenas um ponto do sulfatiazol encontra-se fora do intervalo de aceite, o que atende às exigências da ANVISA.

Tabela 29 – Exatidão calculada para os pontos utilizados na construção da curva analítica (o valor destacado em vermelho encontra-se fora do intervalo de aceite).

Sulfatiazol		Sulfametazina		Sulfadimetoxina	
Concentração (mg kg ⁻¹)	Exatidão	Concentração (mg kg ⁻¹)	Exatidão	Concentração (mg kg ⁻¹)	Exatidão
0,008	83,72	0,01	90,87	0,03	104,62
0,010	80,47	0,02	92,54	0,03	89,94
0,020	94,29	0,02	104,36	0,05	100,39
0,030	101,24	0,03	87,64	0,10	101,52
0,050	104,51	0,05	102,23	0,20	100,29
0,100	101,89	0,10	102,84	0,50	99,91
0,200	100,33	0,20	101,35		
0,500	99,84	0,50	99,70		

4.4.3 Seletividade

Os cromatogramas obtidos na análise de amostras de leite isentas das sulfonamidas estudadas (brancos) foram sobrepostos ao cromatograma dos padrões analíticos na concentração LOQ, para avaliar a presença de possíveis interferentes no tempo de retenção de cada um deles. Na Figura 21 observa-se os cromatogramas de algumas das amostras branco analisadas, nos quais se verifica que não há picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

Figura 21 – Cromatogramas de amostras de leite isentas dos analitos (brancos), comparando-os com cromatograma do padrão analítico na concentração LOQ.

Na Figura 22 encontram-se as curvas analíticas que foram construídas usando padrão matrizado, as quais são comparadas com as curvas dos extratos e dos padrões em solução aquosa, com o objetivo de avaliar o efeito matriz.

Figura 22 – Comparação entre curvas analíticas construídas com extratos, padrão matrizado e padrão em solução aquosa, para visualizar a ocorrência de efeito matriz.

Conforme se observa na Figura 22, à medida que aumenta a concentração dos analitos, ocorre um distanciamento entre as curvas construídas com padrões matrizados e com padrões em solução aquosa, sendo um indício de ocorrência de efeito matriz. Entretanto, para determinar a ocorrência de efeito matriz podem ser utilizados dois testes estatísticos, de acordo com o guia de validação do MAPA (2001):

- Teste F de homogeneidade de variâncias: verifica se as variâncias dos padrões matrizados ($s^2_{i,1}$) e aquosos ($s^2_{i,2}$), num dado nível de concentração i , podem ser consideradas estatisticamente iguais. O F calculado para cada concentração ($F_{calculado,i}$) é obtido pela Equação 11. Caso $F_{calculado,i}$ seja menor do que o F tabelado a 95% de confiança, considera-se que os dois conjuntos de amostras

são iguais e, portanto, a matriz não tem efeito significativo sobre a precisão da análise;

$$F_{\text{calculado},i} = \frac{s_{i,1}^2}{s_{i,2}^2}, \text{ se } s_{i,1}^2 > s_{i,2}^2 \text{ e } F_{\text{calculado},i} = \frac{s_{i,2}^2}{s_{i,1}^2}, \text{ se } s_{i,1}^2 < s_{i,2}^2 \quad (\text{Equação 11})$$

- Teste t de Student: verifica se as respostas (áreas) médias dos padrões matizados ($\bar{x}_{i,1}$) e aquosos ($\bar{x}_{i,2}$), num dado nível de concentração i , são estatisticamente iguais. O t calculado é obtido pela Equação 12, sendo n_1 e n_2 o número de replicatas nos padrões matizados e aquosos, respectivamente. Se o $t_{\text{calculado}}$ for menor do que o t tabelado para $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade, com 95% de confiança, pode-se concluir que a matriz não tem efeito significativo sobre os resultados.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_{i,1} - \bar{x}_{i,2}|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}, \text{ onde } s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_{i,1}^2 + (n_2 - 1)s_{i,2}^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (\text{Equação 12})$$

A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos nos testes F e t de Student, observando-se que não ocorreu efeito da matriz sobre a precisão do método, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi menor do que o F_{tabelado} para todas as concentrações avaliadas. Entretanto, os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram maiores do que os de t_{tabelado} , podendo se enfatizar desse modo que o efeito matriz interfere nas respostas do método (áreas).

Tabela 30 – Resultados dos testes F e t de Student, para verificação de efeito matriz, sendo $F_{\text{tabelado}} = 19,00$ e $t_{\text{tabelado}} = 2,132$, com 95% de confiança (os valores calculado que foram maiores do que os tabelados estão destacados em vermelho).

Sulfatiazol			Sulfametazina			Sulfadimetoxina		
Concentração (mg L ⁻¹)	F _{calculado}	t _{calculado}	Concentração (mg L ⁻¹)	F _{calculado}	t _{calculado}	Concentração (mg L ⁻¹)	F _{calculado}	t _{calculado}
0,008	12,018	5,434	0,013	3,910	1,664	0,025	3,757	3,570
0,010	1,224	2,009	0,015	1,346	9,615	0,030	3,438	7,997
0,020	1,253	4,321	0,020	1,171	11,105	0,050	59,342	80,586
0,030	2,427	3,957	0,030	8,535	17,083	0,100	2,778	97,119
0,050	1,454	5,577	0,050	34,763	20,585	0,200	1,059	102,651
0,100	7,030	11,740	0,100	1,130	135,676	0,500	12,289	154,932
0,200	1,044	24,187	0,200	4,868	79,320			
0,500	1,415	56,691	0,500	9,935	144,820			

4.4.4 Recuperação

Os valores de recuperação foram calculados nas concentrações LOQ, CQB, CQM e CQA, com extrações feitas em quintuplicata em três dias diferentes. Os cálculos da recuperação foram feitos de duas maneiras: uma delas utilizando como resposta de referência a área do padrão em solução aquosa e outra utilizando a do padrão matrizado. Considerando o efeito matriz observado ao avaliar a seletividade do método, acredita-se que a maneira mais confiável de avaliar a eficiência da etapa de extração é utilizando o padrão matrizado ao invés do padrão em solução aquosa. Conforme se observa na Tabela 31, todos os valores de recuperação encontram-se dentro a faixa de aceite (80 – 120%), com DPR < 20% para LOQ e < 15% para as demais concentrações.

Tabela 31 – Valores de recuperação (%) calculados utilizando como referência a área do padrão em solução aquosa (Padrão) e do padrão matrizado (Matriz), juntamente com seus valores de DPR (%).

Concentração	Sulfatiazol			Sulfametazina			Suldimetoxina		
	Recuperação (Padrão)	Recuperação (Matriz)	DPR	Recuperação (Padrão)	Recuperação (Matriz)	DPR	Recuperação (Padrão)	Recuperação (Matriz)	DPR
LOQ	87,90	94,35	18,07	100,43	85,24	14,41	94,12	89,70	6,08
CQB	83,66	97,43	8,34	83,50	95,45	3,66	91,63	108,36	5,33
CQM	88,79	89,72	3,05	88,27	92,04	1,85	95,92	103,56	1,02
CQA	94,08	97,91	3,09	93,69	98,94	2,27	99,03	102,68	1,92

4.4.5 Exatidão

A Tabela 32 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de exatidão do método, juntamente com seus DPRs. Os valores encontram-se dentro da faixa de aceite da ANVISA (2003c), que é de 80 a 120% para o LOQ e de 85 a 115% para as demais concentrações.

Tabela 32 – Valores de exatidão intra-dia e inter-dias (%) calculados para o método analítico.

Concentração	Sulfatiazol		Sulfametazina		Sulfadimetoxina	
	Exatidão intra-dia	Exatidão inter-dias	Exatidão intra-dia	Exatidão inter-dias	Exatidão intra-dia	Exatidão inter-dias
LOQ	84,90	94,49	86,21	88,73	96,33	97,39
CQB	87,87	94,99	89,66	89,96	93,15	93,17
CQM	97,73	101,31	96,95	99,02	95,83	95,10
CQA	104,62	107,60	103,48	104,55	97,37	97,31

4.4.6 Precisão

A Tabela 33 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de precisão intra-dia e inter-dias. Todos os valores de DPR encontram-se de acordo com as exigências da ANVISA (2003c), segundo a qual se admite até 20% para o LOQ e até 15% para as demais concentrações.

Tabela 33 – Precisão intra-dia e inter-dias (%) calculada para o método analítico.

Concentração	Sulfatiazol		Sulfametazina		Sulfadimetoxina	
	Precisão intra-dia	Precisão inter-dias	Precisão intra-dia	Precisão inter-dias	Precisão intra-dia	Precisão inter-dias
LOQ	8,11	17,32	8,45	15,11	10,96	12,81
CQB	4,94	9,65	6,20	5,49	6,09	6,84
CQM	5,93	5,06	3,31	3,92	3,18	3,93
CQA	4,00	4,86	4,37	4,95	3,40	4,07

4.4.7 Estabilidade

A estabilidade foi calculada de acordo com a Equação 13, na qual C_{teste} é a concentração do analito no extrato testado em cada ensaio e $C_{inicial}$ é a concentração do analito no extrato recém-preparado.

$$Estabilidade = \frac{C_{teste}}{C_{inicial}} \times 100\% \quad (\text{Equação 13})$$

De acordo com a ANVISA (2003c), são aceitos resultados entre 80 e 120% para a concentração LOQ e entre 85 e 115% para as demais concentrações. Os resultados obtidos para os diferentes testes de estabilidade encontram-se na Tabela 34, na qual se observa que houve extratos fora da faixa estabelecida nos ensaios de curta duração e nos ciclos de congelamento, concluindo-se que as amostras de leite não devem ser mantidas sem refrigeração e que também não devem passar por sucessivas etapas de congelamento e descongelamento. Nos ensaios de curta duração, verifica-se que as amostras de leite podem ser mantidas em *freezer* por até uma semana. Após esse período, o analito sulfatiazol já tem sua estabilidade prejudicada. A sulfadimetoxina é considerada estável até a segunda semana de congelamento e a sulfametazina, até a quarta semana. Nos ensaios pós-processamento todos os extratos apresentaram resultados dentro da faixa de aceite, indicando que não há problemas em mantê-los no

injetor do HPLC por até 24 horas e que os extratos podem ser guardados em geladeira por até um mês sem sofrerem degradação.

Tabela 34 – Resultados dos testes de estabilidade dos analitos na matriz (os valores fora da faixa de aceite estão destacados em vermelho).

Tipo de ensaio de estabilidade		Resultados de estabilidade								
		Sulfatiazol			Sulfametazina			Sulfadimetoxina		
		LOQ	CQB	CQA	LOQ	CQB	CQA	LOQ	CQB	CQA
Curta duração (20 horas)		101,21	124,02	89,53	95,84	159,18	92,53	98,13	85,83	87,44
Ciclos de congelamento		71,23	70,53	78,07	100,57	83,16	82,81	98,16	89,35	87,13
Longa duração:	1 semana	101,20	85,35	85,62	104,24	96,79	96,28	95,80	93,21	90,04
	2 semanas	77,66	85,95	99,30	104,24	96,79	96,28	95,80	93,21	90,04
	4 semanas	64,54	99,97	103,97	117,72	98,25	99,65	134,73	102,27	96,48
	20 semanas	143,67	48,26	92,45	56,30	73,52	90,31	153,84	113,68	86,60
Pós-processamento: injetor		83,32	86,71	99,93	100,48	101,24	96,91	102,69	90,44	91,56
1 mês (geladeira)		81,87	101,71	108,45	117,81	100,49	101,25	117,01	109,34	99,85

Os resultados obtidos nos ensaios de estabilidade dos analitos em solução aquosa são apresentados na Tabela 35. Verificou-se que ocorreram resultados fora da faixa de aceite apenas após armazenamento das soluções por 15 semanas, tanto em geladeira quanto em *freezer*.

Tabela 35 – Resultados dos testes de estabilidade dos analitos em solução aquosa, armazenados em frascos transparentes e âmbar (os valores fora da faixa de aceite estão destacados em vermelho).

Tipo de ensaio de estabilidade	Resultados de estabilidade					
	Sulfatiazol		Sulfametazina		Sulfadimetoxina	
	Transparente	Âmbar	Transparente	Âmbar	Transparente	Âmbar
Ambiente: 6 horas	109,50	103,85	100,18	95,88	85,08	92,39
Geladeira: 1 semana	116,03	115,95	115,37	103,81	97,83	89,23
2 semanas	100,39	103,67	103,74	104,13	98,69	113,62
15 semanas	113,36	114,18	121,78	110,40	116,10	118,44
Freezer: 1 semana	106,30	100,05	100,20	99,56	91,05	91,39
2 semanas	108,36	106,73	89,49	98,96	82,99	88,21
15 semanas	102,38	103,90	115,20	123,41	116,75	114,12

4.4.8 LOD e LOQ

Os valores de LOD e LOQ obtidos para os analitos são apresentados na Tabela 36. Verifica-se que os LOQs estão abaixo do LMR das sulfonaminas em leite, que é de 0,1 mg kg⁻¹ para a soma das sulfonamidas presentes. Desse modo, o método pode ser considerado adequado para analisar a conformidade de amostras de leite, considerando a concentração de resíduos das sulfonamidas estudadas.

Tabela 36 – LODs e LOQs obtidos para o método analítico.

Analitos	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
STZ	0,004	0,008
SMZ	0,005	0,013
SDM	0,015	0,025

4.5 Análise das amostras de leite

Não foi possível detectar resíduos das sulfonamidas estudadas em nenhuma das amostras de leite coletadas no comércio local do município de São Carlos. Esse resultado sugere que o leite pasteurizado e UHT comercializado na região encontra-se livre de resíduos desses antibióticos, considerando o LOD do método desenvolvido.

5 CONCLUSÕES

A utilização de planejamento experimental mostrou-se eficiente na otimização das condições cromatográficas das sulfonamidas sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina, obtendo-se uma boa separação entre os picos cromatográficos e otimizando a altura dos picos e a relação entre sua área e largura. Considerando a importância do desenvolvimento de metodologias analíticas mais limpas, bem como a proposta do presente estudo em seguir princípios da química verde, foram obtidos bons resultados, utilizando um solvente renovável e menos tóxico do que os tradicionalmente utilizados em HPLC, e uma vazão relativamente baixa, que representa menor consumo de solvente e menor geração de resíduos.

No método de extração QuEChERS, os resultados obtidos com as modificações propostas mostraram recuperações superiores a 85%, considerando como referência o padrão matrizado, para os analitos em concentrações inferiores ao LMR estabelecido pela legislação ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para o somatório das sulfonamidas). O *clean up* da amostra mostrou-se satisfatório, por não haver interferências na análise cromatográfica. O solvente extrator acetonitrila não é considerado verde, devido a sua toxicidade, porém é menos tóxico do que solventes clorados e metanol, além de ser menos volátil, expondo o analista a menores quantidades de vapores durante a extração. Foi necessário evaporar o solvente extrator antes da análise cromatográfica, o que é uma desvantagem, porém, apesar disso, o método desenvolvido pode ser considerado apropriado para a extração dos analitos na matriz leite bovino, tendo obtido bom desempenho nos testes de validação, realizados de acordo com os requisitos da ANVISA, do MAPA e da União Europeia.

No método de extração SPE não foram obtidos resultados de recuperação e *clean up* suficientemente bons para a continuidade do desenvolvimento e validação do

método. Foram testados diferentes tipos de fases sólidas, solventes de eluição e etapas de pré-tratamento da amostra, porém os valores de recuperação não ultrapassaram 30% e houve picos co-eluinto com os analitos nas análises cromatográficas. Desse modo, apesar de haver diversos estudos que descrevem a utilização de SPE para analisar sulfonamidas em leite, esse método de extração não se mostrou adequado no presente estudo. Acredita-se que as sulfonamidas sejam perdidas durante a etapa de pré-tratamento da amostra, a qual é importante para permitir a passagem da amostra pela fase sólida do cartucho de SPE.

Na análise de amostras de leite, de diferentes tipos e marcas, adquiridas no comércio local de São Carlos, não houve detecção dos analitos em estudo, indicando que o leite não oferece riscos à saúde dos consumidores quanto à presença desses antibióticos, considerando os LODs do método analítico.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de não ter sido detectada a presença das sulfonamidas nas amostras de leite coletadas no presente estudo, este problema é reportado na literatura e focado pela ANVISA (2003b) e pelo MAPA (PNCRC, 2009). Uma sugestão para estudos futuros seria fazer coletas em parceria com laticínios da região, analisando o leite que chega para ser processado. Assim, o método desenvolvido (QuEChERS-HPLC-DAD) poderia ser utilizado para complementar os resultados obtidos com os testes já realizados rotineiramente pelo laticínio. Essa amostragem poderia ser feita em diferentes períodos do ano, para verificar se há influência da sazonalidade na quantidade de resíduos presentes no leite.

Outro aspecto importante que poderia ser estudado é o tratamento dos resíduos gerados pelo método analítico. Atualmente, o tratamento do resíduo gerado pela extração, feito pelo Laboratório de Resíduos Químicos do Instituto de Química de São Carlos, consiste em: separar a fase aquosa, precipitar os íons magnésio e acetato e neutralizá-la; separar as proteínas do leite; e incinerar a fase de MeCN, devido à dificuldade em separar as sulfonamidas presentes. O resíduo resultante das análises cromatográficas (EtOH, água e sulfonamidas) também é encaminhado para incineração, devido à presença das sulfonamidas. Desse modo, seria interessante

estudar um método de tratamento que pudesse remover as sulfonamidas tanto da fase de MeCN, resultante da extração, quanto do resíduo produzido pelas análises cromatográficas. Isso poderia evitar a necessidade de incineração e também permitir o reuso dos solventes EtOH e MeCN para determinados fins.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, V. K. Application of solid-phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 16, p. 3793-3799, 1993.

AGARWAL, V. K. High-performance liquid chromatographic methods for determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 624, p. 411-423, 1992.

AGUILERA-LUIZ, M. M.; VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, 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.

ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; TIGLEA, P.; SABINO, M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1587-1592, 2007.

ALBERGUINI, L. B. A.; SILVA, L. C.; RESENDE, M. O. O. **Tratamento de resíduos químicos**: guia prático para a solução dos resíduos químicos em instituições de ensino superior. São Carlos: RiMa, 2006. 106p.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 215-222, 2002.

ALTUG, T. Contaminants. In: _____. **Introduction to toxicology and food**. Boca Raton: CRC, 2002, p. 53-79.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Is my calibration linear?. **Analyst**, v. 119, p. 2363-2366, 1994.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; 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 the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANDRADE-EIROA, A.; DIÉRVATE, P.; DAGAUTE, P. Improved optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mixtures resolution in reversed-phase high-performance liquid chromatography by using factorial design and response surface methodology. **Talanta**, v. 81, p. 265-274, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 253**, de 16 de setembro de 2003a. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=8128&word=PAMvet>>. Acesso em: 03 ago. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet – 2003b**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução – RE Nº 899**, de 29 de maio de 2003c. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 20 jan. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Relatório 2004/2005** – Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo. PAMVet, março de 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2009.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, p. 2476-2481, 2009.

AZOFRA, R. D.; SARABIA, L. A.; ORTIZ, M. C. Optimization of a solid-phase extraction procedure in the fluorimetric determination of sulfonamides in milk using second-order advantage of PARAFAC and D-optimal design. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 923-935, 2010.

BARMPALEXIS, P.; KANAZE, F. I.; GEORGARAKIS, E. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1192-1202, 2009.

BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M.; SILVA, M. H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p. 69-73, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BOHM, D. A.; STACHEL, C. S.; GOWIK, P. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8217-8223, 2009.

BRAGA, G. L. Cromatografia em papel. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 47-66.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JÚNIOR, E. V. (Ed.). **Produção de leite e sociedade**: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil. Belo Horizonte: FEP MVZ, 2001, p. 61-74.

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. **Resíduos de antibióticos no leite**. Comunicado Técnico, 44. Embrapa Gado de Leite (2005). Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/publicacoes/comunicado/COT44.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2009.

BURG, R. W. Trends in the use of fermentation products in agriculture. In: MOATS, W. A. (Ed.). **Agricultural uses of antibiotics**. Washington: ACS, 1986. p. 61-72.

BYLUND, G. The chemistry of milk. In: _____. **Dairy processing handbook**. Lund: Tetra Pak Processing Systems, 1995, p. 13-36.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC**: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI COECIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 558-566, 2003.

COMMISSION DECISION 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Community**, v. L 221, p. 8-36, 2002.

COMMISSION REGULATION EU No 37/2010. Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of European Community**, v. L15, p. 1-72, 2010.

COSTA, D. L. L. B. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para análise multi resíduo de produtos veterinários em leite bovino através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**. 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 209-218, 2004.

DINCEL, A.; BASCI, N. E. An experimental design approach to select the optimum LC conditions for the determination of local anaesthetics. **Chromatographia**, v. 66, p. S81-S85, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. **Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC** (2008). Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/cons_2004-2726rev4_en.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2011.

FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, p. 80-82, 2007.

FERREIRÓS, N.; IRIARTE, G.; ALONSO, R. M.; JIMÉNEZ, R. M. MultiSimplex and experimental design as chemometrics tool to optimize a SPE-HPLC-UV method for the determination of eprosartan in human plasma sample. **Talanta**, v. 69, p. 747-756, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry**: bioanalytical method validation (2001). Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2011.

FOX, P. F. Milk proteins: general and historical aspects. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry**. New York: Black Academic & Professional, 2003. Part A, p. 1-48.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: _____. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Black Academic & Professional, 1998. Part B, p. 146-200.

FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimethoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p. 185-191, 2000.

FURUSAWA, N.; KISHIDA, K. High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, p. 1031-1033, 2001.

GAMBA, V.; TERZANO, C.; FIORONI, L.; MORETTI, S.; DUSI, G.; GALARINI, R. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides by liquid chromatography with diode array detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 18-23, 2009.

GIROTTI, G.; NOGUEIRA, K. L.; MOURA, J. A. SOUZA, J. B.; GIACOMETTI, L. L.; MARCHI, M. R. R.; TOGNOLLI, J. O. Estrógenos em água: otimização da extração em

fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. **Eclética Química**, v. 32, p. 61-67, 2007.

HARANG, V.; KARLSSON, A.; JOSEFSON, M. Liquid chromatography method development and optimization by statistical experimental design and chromatogram simulations. **Chromatographia**, v. 54, p. 703-709, 2001.

HAYS, V. W. Benefits and risks of antibiotics use in agriculture. In: MOATS W. A. (Ed.). **Agricultural uses of antibiotics**. Washington: ACS, 1986, p. 74-87.

HELLER, D. N.; NOCHETTO, C. B.; RUMMEL, N. G.; THOMAS, N. H. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatographic/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and β -lactam residues. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 54, p. 5267-5278, 2006.

IULIANI, P.; CARLUCCI, G.; MARRONE, A. Investigation of the HPLC response of NSAIDs by fractional experimental design and multivariate regression analysis. Response optimization and new retention parameters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 46-55, 2009.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 273-397.

JONES, G. M. **On-farm tests for drug residues in milk**. Virginia Cooperative Extension, Virginia State University, 2009. Disponível em: <<http://pubs.ext.vt.edu/404/404-401/404-401.html>>. Acesso em: 02 ago. 2009.

KANG, J. H.; JIN, J. H.; KONDO, F. False-positive outcome and drug residue in milk samples over withdrawal time. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 908-913, 2005.

KIM, D. H.; CHOI, J. A.; KIM, J.; LEE, D. W. Application of a polymeric solid phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by LC/MS. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, p. 1149-1159, 2003.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, 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.

KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimetamine in Bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, p. 102-111, 2007.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Sulfonamidas. In:_____. **Química farmacêutica**. Tradução de Andrejus Korolkovas. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982, p. 547-559.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96p.

LAROCQUE, L.; CARIGNAN, G.; SVED, S. Sulfamethazine (sulfadimidine) residues in Canadian consumer milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 73, p. 365-367, 1990.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J. Evaluation of two easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 88, p. 630-638, 2005.

LEHOTAY, S. J. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues. In: VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. (Eds.). **Methods in biotechnology**. Totowa: Humana Press, 2005. v. 19, p. 239-261.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green Chemistry" – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Acid coagulation of milk. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**. 3^a ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. v. 1, p. 1001-1025.

MAJORS, R.; SLACK, G. Sample preparation. In: SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. New York: John Wiley, 1997. p. 100-174.

MAMANI, M. C. V.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 117, p. 545-552, 2009.

MARQUES, M. V.; NACIUK, F. F.; MELLO, A. M. S.; SEIBEL, N. M.; SANTOS, J. G. R.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência via azoderivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1817-1820, 2008.

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7001-1008, 2006.

MELLER, A. C.; TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R.; MUSSOI, E. Antibióticos em leite cru consumido na cidade de Santa Maria, RS. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 4, p. 169-172, 1974.

MERCOSUL. **GMC/Res. Nº54/00: Metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal** (2000).Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/54_00.htm>. Acesso em: 20 jan. 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Guia de validação de procedimentos analíticos e controle de qualidade**. Diário Oficial da União, n. 6, 10 jan. 2011, p. 9-13.

MITSCHER, L. A. Antibiotics and antimicrobial agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 819-866.

MOATS, W. A. Physicochemical methods for identifying antibiotic residues in food. In: _____. (Ed.). **Agricultural uses of antibiotics**. Washington: ACS, 1986. p. 154-167.

NEMUTLU, E.; KIR, S.; KATLAN, D.; BEKSAÇ, M. S. Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: application to validation and quantification of cefepime, cefixime, and cefoperazone. **Talanta**, v. 80, p. 117-126, 2009.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 391-393, 2007.

NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. Nonmessenger targets for drug action III: exogenous pathogens and toxins. In: _____. **Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach**. Oxford: Oxford University, 2005, p. 543-599.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PROGRAMA DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM LEITE (PNCRC). **Instrução Normativa nº 14**, de 25 de maio de 2009. Anexo II. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=15296>>. Acesso em: 12 ago. 2009.

SAMANIDOU, V. F.; TOLIK, E. P.; PAPADOYANNIS, I. N. Chromatographic residue analysis of sulfonamides in foodstuffs of animal origin. **Separation and Purification Reviews**, v. 37, p. 327-373, 2008.

SCHENCK, F. J.; CALLERY, P. S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 814, p. 99-109, 1998.

SILVA, M. V. M.; SARMENTO, A. M. C.; FRANCA, A. P. Resíduos de antibióticos em leite: uma preocupação constante. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 39., 2008, Gramado. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008, ref. R0568-1.

SHAHANI, K. M.; WHALEN, P. J. Significance of antibiotics in food and feeds. In: MOATS, W. A. (Ed.). **Agricultural uses of antibiotics**. Washington: ACS, 1986. p. 88-99.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Basics of separation. In: _____. **Practical HPLC method development**. New York: John Wiley, 1997. p. 21-58.

SPANILÁ, M.; PAZOUREK, J.; FARKOVÁ, M.; HAVEL, J. Optimization of solid-phase extraction using artificial neural networks in combination with experimental design for determination of resveratrol by capillary zone electrophoresis in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p. 180-185, 2005.

STOLKER, A. A. M.; RUTGERS, P.; OOSTERINK, E.; LASAROMS, J. J. P.; PETERS, R. J. B.; VAN RHIJN, J. A.; NIELEN, M. W. F. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 2309-2322, 2008.

TAPPIN, M. R. R.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C.; LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1090-1095, 2008.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulfonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, p. 362-384, 2006.

YODEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists**. AOAC: Arlington, 1975. 88p.

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