

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de métodos analíticos para extração e pré-concentração
de sulfonamidas totais em amostras de leite e carne bovina**

Laís Alves Maroubo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2022**

Laís Alves Maroubo
Licenciada em Química

**Desenvolvimento de métodos analíticos para extração e pré-concentração de
sulfonamidas totais em amostras de leite e carne bovina**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **WANESSA MELCHERT MATTOS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Piracicaba
2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Maroubo, Laís Alves

Desenvolvimento de métodos analíticos para extração e pré-concentração de sulfonamidas totais em amostras de leite e carne bovina / Laís Alves Maroubo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

100 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Microextração líquido-líquido dispersiva 2. Microextração sólido-líquido dispersiva 3. Sulfonamidas 4. Alimentos de origem animal 5. Medidas de imagens digitais 5. Química Analítica Verde I. Título

DEDICATÓRIA

A todos os professores e pesquisadores, sobretudo às mulheres cientistas que, apesar do pouco reconhecimento e valorização profissional, atuam de modo exemplar no desenvolvimento da ciência visando beneficiar a vida em sociedade e reduzir os impactos ambientais ao redor do mundo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas bênçãos, proteção e liderança, me conferindo coragem, sabedoria, ânimo e determinação para que eu me mantivesse firme e forte nesta jornada acadêmica, sobretudo durante este último ano em que milhares vidas foram ceifadas em decorrência da Covid-19. Por isso, também sou grata a Ele pela minha saúde física e emocional.

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP)**, pelo acolhimento e fornecimento de estrutura básica e necessária à minha formação como doutora.

Ao apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001, pelo suporte extremamente necessário à minha permanência durante esses anos.

À minha querida orientadora **Prof. Dra. Wanessa M. Mattos**, por incentivar a mim, meus colegas do grupo de pesquisa e demais graduandos, a sempre buscar o conhecimento, amadurecimento, respeito, integridade e ética dentro da academia. Graças a sua excelente formação pessoal e profissional, sempre nos inspirou, encorajou e expandiu nossos horizontes para que atingíssemos nossa ascensão acadêmica. A ela, sou imensamente grata por ter aceitado, sem hesitar, o desafio de me orientar mesmo diante das adversidades que vivenciei durante a pós-graduação e por ter acreditado em minha capacidade quando eu já não mais acreditava. Agradeço ainda, não somente pela orientação, confiança e paciência a mim atribuídas, mas também pela grande amizade estabelecida dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos professores **Prof. Dr. Pedro E. D. Augusto** e **Prof. Dr. Fernando L. Cônsoli**, por terem prestado o suporte necessário para que eu me mantivesse na pós-graduação. São pessoas de caráter indiscutível, e sem eles certamente eu não teria chegado até aqui.

Aos professores que compõem a banca avaliadora, pelo aceite e disposição em ler, avaliar e contribuir com discussões ricas e pertinentes ao aprimoramento deste trabalho.

A todos os professores mencionados, toda minha gratidão, carinho, respeito e admiração pela competência e dedicação voltadas à pesquisa acadêmica, contribuindo enormemente para uma ciência brasileira séria e de qualidade.

Aos meus amigos e colegas do **Grupo de Estudos em Química Analítica Verde (GEQAV)**, sobretudo ao **Winston** e **Alessandra**, que através de trocas de experiências e construção de conhecimentos científicos, contribuíram para minha evolução de modo leve e descontraído.

Às demais amigas que a jornada acadêmica me presenteou, **Dayane, Gabriela, Gislene e Samara**, às amigas de moradia **Ana Lígia, Rosely, Bruna, Alessandra, Kethlin e Ferdynanda**, que me proporcionaram muitos aprendizados, horas de conversas, risos e choros, almoços, cafés, jantares e momentos de descontração. Agradeço os ensinamentos, confidências, força, apoio, companheirismo, colaboração e discussões científicas durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Todas vocês tornaram o desafio do doutorado muito mais alegre e leve, marcando esta fase de modo único e especial. Desejo muito sucesso a todas!

Por fim – e não menos importante – agradeço aos meus pais **Marcos e Lúcia Maroubo**, que incansavelmente dedicam suas vidas a mim e ao meu irmão, nos ensinando os principais valores da vida: honestidade, humildade, caráter, respeito, dignidade e amor à família. Agradeço também ao meu irmão **Lucas Maroubo**, por ser meu parceiro e confiante em tudo na vida, desde a infância até os dias atuais. Obrigada por me ouvir, aconselhar, orientar e ajudar a crescer pessoal e profissionalmente. Aos avós **José** (in memoriam), **Dirce** e **Maria Aparecida** (in memoriam) pelos cuidados, auxílios e orações. Aos queridos tios

*Anna, Ary, Clarice e Isabel, por todo incentivo, torcida e suporte financeiro e emocional sempre que precisei. Ao meu esposo **Eliei**, por todo amor, respeito e cuidado dedicados a mim e à nossa relação. Agradeço-o também pela empatia e compreensão nas vezes em que precisei me ausentar e dedicar inteiramente à pesquisa, além do suporte emocional fornecido durante esta etapa tão importante.*

Vocês são exemplo e inspiração para mim. Eu os amo muito! A estes, minha sincera gratidão por terem contribuído com a minha criação e formação, por acreditarem em minha capacidade de concluir mais esta etapa, e me incentivarem em todos meus momentos de fraqueza e dúvida, me motivando a persistir nos meus sonhos, apoiando sempre com muito carinho, amor, fé e paciência. E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para que essa etapa fosse concluída com seriedade, responsabilidade e sucesso.

Muito obrigada!

“Divulga-se, enfim (e por que negar?), para satisfazer o desejo que alguns sentem, de partilhar com muitos outros o produto de sua experiência, adquirida seja diretamente no curso de seu próprio trabalho criador, seja mediante a absorção de informação colhida em fontes menos acessíveis ao grande público e o esforço de compreender essa informação, de situá-la dentro do quadro geral do conhecimento e de analisa-lhe as possíveis implicações. Esse desejo, essa alegria, essa volúpia (como queiram) de transmitir fácil o que se obteve difícil.”

José Reis

Reflexões sobre a divulgação científica, 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos específicos.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1. Leite e carne bovina.....	25
3.2. Antimicrobianos	28
3.3. Desenvolvimento de procedimentos analíticos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1. Amostras.....	49
4.2. Analitos.....	49
4.3. Derivatização química	50
4.4. Reagentes e soluções	50
4.5. Equipamentos e acessórios	51
4.6. Procedimento experimental	52
4.6.1. Preparo de amostra de leite.....	52
4.6.2. Extração e pré-concentração de sulfonamidas das amostras de leite bovino	53
4.6.3. Extração e pré-concentração de sulfonamidas das amostras de carne bovina.....	53
4.6.4. Método de referência	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Microextração líquido-líquido dispersiva de sulfonamidas totais em leite bovino	55
5.1.1. Otimização dos parâmetros físico-químicos.....	55
5.2. Microextração sólido-líquido dispersiva de sulfonamidas totais em carne bovina	70
5.2.1. Otimização dos parâmetros físico-químicos.....	70
6. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87

RESUMO

Desenvolvimento de métodos analíticos para extração e pré-concentração de sulfonamidas totais em amostras de leite e carne bovina

As sulfonamidas são antimicrobianos sintéticos de baixo custo amplamente utilizados na medicina veterinária e humana para tratar doenças, controlar e prevenir infecções. O uso indiscriminado destas substâncias na medicina veterinária pode levar ao aparecimento de resíduos nos alimentos em níveis inseguros à saúde humana. Longos períodos de exposição às SAs podem causar efeitos adversos como resistência bacteriana, problemas cardíacos, reações alérgicas e disfunções hepáticas e digestivas. No intuito de promover a segurança dos alimentos de origem animal produzidos no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária criou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. O limite máximo de resíduos estabelecido no Brasil para o somatório de sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol em alimentos de origem animal como o leite e a carne bovina é de 100 ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$). A União Europeia considera o mesmo valor para o total combinado dos resíduos de todas as substâncias do grupo das sulfonamidas. Seguindo os preceitos da Química Analítica Verde, este estudo visou avaliar a microextração líquido-líquido dispersiva e microextração sólido-líquido dispersiva como alternativa às técnicas convencionais para a extração de sulfonamidas totais em amostras de leite e carne bovina, respectivamente. Os procedimentos envolveram a reação colorimétrica necessária à determinação do analito em amostras de leite e carne bovina. Tal reação baseou-se na formação de composto de cor rosa (sal imino) decorrente da condensação entre o grupo amino das sulfonamidas com o grupo carbonila do cromóforo 4-dimetilaminocinamaldeído em meio ácido na presença de surfactante. Posteriormente, para ambas as amostras, as microextrações líquido-líquido dispersiva e sólido-líquido dispersiva foram feitas utilizando 1-butanol como solvente extrator. As medidas dos sinais analíticos para a determinação das sulfonamidas foram realizadas por meio de medidas de imagens digitais através de aplicativo gratuito instalado em smartphone. Como resultado, para amostras de leite, a resposta linear foi observada entre 50 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para sulfonamidas totais, descrita pela equação: Sinal analítico = $3,02 + 0,03 C$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($R^2 = 0,999$). O coeficiente de variação ($n = 11$; 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de sulfonamidas totais) e o limite de detecção foram estimados em 0,49% e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Para 500 μL de amostra de leite, foram consumidos 49,00 mg de ácido tricloroacético, 0,75 mg de 4-dimetilaminocinamaldeído, 17,00 mg de dodecil sulfato de sódio, e 500 μL de 1-butanol, gerando apenas 3,75 mL de resíduos por amostra. Método de adição-recuperação foram realizados com recuperações estimadas entre 88 e 100%. Os resultados obtidos foram concordantes com procedimento de referência empregando cromatografia líquida de alta eficiência com nível de confiança de 95%. Para amostras de carne, a resposta linear foi observada entre 33 e 233 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfonamidas totais, descrita pela equação: Sinal analítico = $0,33 + 0,03 C$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ($R^2=0,998$). O coeficiente de variação ($n = 11$; 67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sulfonamidas totais) e o limite de detecção foram estimados em 0,63% e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para 750 mg de amostra de carne, foram consumidos 0,11 mg de 4-dimetilaminocinamaldeído, 2,60 mg de dodecil sulfato de sódio e 275 μL de 1-butanol, gerando apenas 335 μL de resíduo por amostra. Método de adição-recuperação foram realizados, obtendo-se de 71 a 100% de recuperação, indicando a ausência de efeitos de matriz, e demonstrando a precisão do procedimento desenvolvido.

Palavras-chave: Microextração líquido-líquido dispersiva, Microextração sólido-líquido dispersiva, Sulfonamidas, Alimentos de origem animal, Medidas de imagens digitais, Química Analítica Verde

ABSTRACT

Development of analytical methods for extraction and pre-concentration of total sulfonamides in milk and meat samples

Sulfonamides are low-cost synthetic antimicrobials that are widely used in both veterinary and human medicine to treat diseases and control and prevent infections. The indiscriminate use of these substances in veterinary medicine can cause the appearance of residues in food at levels that are unsafe for human health. Long periods of exposure to sulfonamides can cause adverse effects such as bacterial resistance, heart problems, allergic reactions, and hepatic and digestive disorders. To promote the safety of food of animal origin produced in Brazil, the Ministry of Agriculture and Supply created the National Plan for the Control of Residues and Contaminants in Products of Animal Origin, and the National Health Surveillance Agency created the Program for the Analysis of Residues of Veterinary Medicines in Food of Animal Origin. The maximum residue limit established in Brazil for the total amount of sulfamethazine, sulfadimethoxine and sulfathiazole in foods of animal origin such as milk and meat are 100 ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g kg}^{-1}$). The European Union considers the same value for the combined total of residues of all substances in the group of sulfonamides. Following the principles of Green Analytical Chemistry, this study aimed to employ dispersive liquid-liquid microextraction and dispersive solid-liquid microextraction as an alternative to conventional techniques for the extraction of total sulfonamides in milk and meat samples, respectively. The procedures involved the colorimetric reaction necessary to determine the analyte in milk and meat samples. This reaction was based on the formation of a pink compound (imine salt) resulting from the condensation between the amino group of sulfonamides and the carbonyl group of the chromophore 4-dimethylaminocinnamaldehyde in an acidic medium in the presence of surfactant. Subsequently, for both samples, dispersive liquid-liquid and dispersive solid-liquid microextractions were performed using 1-butanol as extracting solvent. The measurements of the analytical signals for the determination of sulfonamides were carried out through digital image measurements through a free application installed on a smartphone. As a result, for milk samples, a linear response was observed in the concentration range of 50–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for total sulfonamides, described by the following equation: Analytical signal = $3.02 + 0.03 C$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($R^2 = 0.999$). The coefficient of variation ($n = 11$; 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ total sulfonamides) and the detection limit were estimated to be 0.49% and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. For 500 μL of milk sample, 49.00 mg of trichloroacetic acid, 0.75 mg of 4-dimethylaminocinnamaldehyde, 17.00 mg of sodium dodecyl sulfate, and 500 μL of 1-butanol were consumed, and the analysis generated only 3.75 mL of residues per sample. Addition-recovery methods were performed with estimated recoveries between 88 and 100%. The results agreed with the reference procedure by high performance liquid chromatography with a confidence level of 95%. To meat samples, a linear response was observed in the concentration range 33–233 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for total sulfonamides, described by the following equation: Analytical signal = $0.33 + 0.03 C$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ($R^2 = 0.998$). The coefficient of variation ($n = 11$; 67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of total sulfonamides) and the detection limit were estimated to be 0.63% and 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. For a 750 mg meat sample, 0.11 mg of 4-dimethylaminocinnamaldehyde, 2.60 mg of sodium dodecyl sulfate, and 275 μL of 1-butanol were consumed, and the analysis generated only 335 μL of residue per sample. Addition-recovery methods were performed resulting 71 to 100% recovery, indicating the absence of matrix effects, and demonstrating the precision of the developed procedure.

Keywords: Dispersive liquid-liquid microextraction, Dispersive solid-liquid microextraction, Sulfonamides, Product of animal origin, Digital images measurement, Green Analytical Chemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da sulfanilamida.	32
Figura 2. Diagrama simplificado demonstrando a injeção da mistura dos solventes, a dispersão do solvente extrator e a partição do analito entre a amostra e o solvente extrator. .	40
Figura 3. Publicações referentes aos métodos analíticos para a determinação de sulfonamidas entre 1990 e 2021.	42
Figura 4. Tipos de alimentos de origem animal comumente analisados para sulfonamidas. ..	43
Figura 5. Publicações sobre métodos de determinação de sulfonamidas em função da.....	46
Figura 6. Reação entre sulfametazina e p-DAC em meio ácido.	50
Figura 7. Suporte adaptado para medidas de imagens digitais.	52
Figura 8. Etapas envolvidas no procedimento de extração e pré-concentração de sulfonamidas totais em amostras de leite bovino.	53
Figura 9. Etapas envolvidas no procedimento de extração e pré-concentração de sulfonamidas totais em amostras de carne bovina.....	54
Figura 10. Efeito da concentração de ácido na reação colorimétrica de SAs com p-DAC em amostras de leite bovino.....	55
Figura 11. Efeito do tipo e concentração de surfactante utilizado na reação colorimétrica de SAs com p-DAC em amostras de leite bovino.	56
Figura 12. Efeito do tipo de solvente para extração em amostras de leite bovino.....	57
Figura 13. Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho). (a) parâmetro químicos e (b) parâmetros físicos.	60
Figura 14. Coeficientes de regressão: (1) média; (2) variável 1; (3) variável 2; (4) interação 1 ² ; (5) interação 2 ² e (6) interação 12. (a) parâmetro químico: (2) volume de amostra e (3) volume de 1-butanol; (b) parâmetro físico: (2) tempo de centrifugação e (3) velocidade de centrifugação.....	61
Figura 15. Gráficos de superfície de resposta e de contorno: parâmetros (a) químico e (b) físico.....	62
Figura 16. Efeito do volume de 1-butanol para extração em amostras de leite bovino.....	63
Figura 17. Curvas de calibração para extração de SAs de amostras de leite com 0,50 (●) e 1,25 mL (○) de 1-butanol.	64
Figura 18. Comparação entre os sinais analíticos obtidos por imagens digitais e espectrofotometria.....	66

Figura 19. Efeito do tipo de solvente na reação colorimétrica de SAs com p-DAC em amostras de carne bovina.....	71
Figura 20. Porcentagem dos efeitos em relação às variáveis e interações, (1) tipo de agitação; (2) tempo de agitação; (3) tempo de centrifugação; (4) interação 12; (5) interação 13; (6) interação 23 e (7) interação 123.	75
Figura 21. Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).	76
Figura 22. Coeficientes de regressão: (1) média; (2) variável 1; (3) variável 2; (4) interação 1 ² ; (5) interação 2 ² e (6) interação 12.....	77
Figura 23. Gráficos de superfície de resposta e de contorno para os parâmetros físicos.	78
Figura 24. Curva de calibração para extração de SAs de amostras de carne bovina com 275 µL de 1-butanol.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os 12 Princípios da Química Analítica Verde.	38
Tabela 2. Sulfonamidas recomendadas para monitoramento segundo MAPA e ANVISA.	49
Tabela 3. Delineamentos fatoriais propostos para otimização dos parâmetros experimentais.	58
Tabela 4. Planejamento 2^2 + PC + axial com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.	59
Tabela 5. Planejamento 2^2 + PC + axial com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.	59
Tabela 6. Ensaio de adição e recuperação para análise de espécies potencialmente interferentes.	63
Tabela 7. Ensaio de adição e recuperação (n=3) para determinação de sulfonamidas totais em amostras de leite bovino.	67
Tabela 8. Determinação de sulfonamidas em amostras de leite enriquecido com 100 ou 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ pelo procedimento proposto e de referência.	67
Tabela 9. Características analíticas de métodos de microextração para determinação de sulfonamidas em amostras de leite bovino.	69
Tabela 10. Otimização do tipo de solvente para extração em amostras de carne bovina.	70
Tabela 11. Otimização do volume de 1-butanol para extração em amostras de carne bovina.	72
Tabela 12. Otimização da massa de amostra para extração em carne bovina.	72
Tabela 13. Delineamento fatorial proposto para otimização do tipo e tempo de agitação e tempo de centrifugação.	73
Tabela 14. Planejamento 2^2 + PC + axial com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.	73
Tabela 15. Delineamento fatorial proposto para otimização do tipo e tempo de agitação e centrifugação.	74
Tabela 16. Planejamento 2^3 com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.	74
Tabela 17. Delineamento fatorial proposto para otimização do tempo de agitação em mesa orbital e tempo de centrifugação.	76
Tabela 18. Planejamento 2^2 + PC + axial com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.	76
Tabela 19. Ensaio de adição e recuperação para determinação de sulfonamidas totais em amostras de carne bovina.	80

Tabela 20. Características analíticas de métodos de microextração para determinação de sulfonamidas em amostras de carne bovina.	81
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIA	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação
ABLV	Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE-UV	Eletroforese Capilar com Detecção Ultravioleta
CICARNE	Centro de Inteligência da Carne Bovina
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DDAB	Brometo de Didodecildimetilamônio
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
DLLME-SFOD	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva baseada na Solidificação de uma Gota Orgânica Flutuante
DRfA	Dose de Referência Aguda
DSLME	Microextração Sólido-Líquido Dispersiva
DSPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva
DTAB	Brometo de Dodeciltrimetilamônio
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
GC-MS/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
HF-LPME	Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca
HPLC-FL	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detecção por Fluorescência
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detecção por Ultravioleta
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IFA	Insumos Farmacêuticos Ativos
IL-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Líquido Iônico
IL-MA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Micro-ondas à base de Líquido Iônico

LC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa em tandem
LD	Limite de Detecção
LDS-SD-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersivo de Desemulsificação à base de Solvente de Baixa Densidade
LED	Diodo Emissor de Luz
LLE	Extração Líquido-Líquido
LLE-LTP	Extração Líquido-Líquido com Partição à Baixa Temperatura
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LPME	Microextração em Fase Líquida
LT-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva de Baixa Toxicidade
MA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Micro-ondas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIL-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Líquido Iônico Magnético
MS	Ministério da Saúde
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PABA	Ácido p-Aminobenzóico
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
p-DAC	p-Dimetilaminocinamaldeído
PGE	Eletrodo de Grafite Pirolítico
PIB	Produto Interno Bruto
PLE	Extração Líquida Pressurizada
PNCRC Animal	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
PSA	Amina Primária e Secundária
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto, Seguro
RP-HPLC-FL	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa com Detecção

	de Fluorescência
RP-HPLC-PDA	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa com Detecção por Arranjo de Fotodiodos
SA	Sulfonamida
SA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Surfactante
SDME	Microextração de Gota Única
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDX	Sulfadimetoxina
SMD	Dispositivo Montado em Superfície
SMZ	Sulfametazina
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em Fase Sólida
STZ	Sulfatiazol
TCA	Ácido Tricloroacético
TLC	Cromatografia de Camada Delgada
UA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Ultrassom
UA-IL-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Líquido Iônico Assistida por Ultrassom
UHT	Ultra-high Temperature
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
VA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Vortex

1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina é um dos principais setores do agronegócio brasileiro. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, sendo o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e terceiro maior produtor de leite (IBGE, 2020).

O leite é uma das commodities agropecuárias mais importantes do mundo. Todos os dias, bilhões de pessoas no mundo consomem leite nas mais diversas formas e, por esta razão, este alimento representa importância econômica como fonte de renda e sobrevivência para grande parte da população mundial, além de ser uma fonte vital de nutrição (SIQUEIRA, 2019b). Com o volume de 34,8 bilhões de litros produzidos em 2019, o Brasil é, atualmente, o terceiro maior produtor mundial de leite e derivados, permanecendo atrás apenas dos Estados Unidos e Índia (SILVA, 2019). Com aproximadamente 1 milhão de produtores nacionais, a indústria leiteira movimenta mais de R\$ 100 bilhões de reais ao ano, gerando mais de 4 milhões de empregos (MAPA, 2021). No Brasil, a indústria de laticínios é o segundo segmento mais importante da indústria de alimentos. Os níveis de consumo variam consideravelmente entre os países e são influenciados principalmente pela situação socioeconômica e cultural. O consumo aparente per capita em 2018 foi de 166,4 litros habitante⁻¹ ano⁻¹, valor dentro do consumo recomendado para países desenvolvidos (EMBRAPA, 2021a; FAO, 2013). Em relação à produção, comercialização e consumo de carne bovina, o Brasil está entre um dos mais importantes produtores e exportadores no mundo – resultado de décadas de investimento em tecnologia e melhoramento genético. A alta na produtividade e na qualidade do produto brasileiro o tornou competitivo, chegando ao mercado de mais de 150 países (EMBRAPA, 2021a).

Em 2015, o Brasil se posicionou com o maior rebanho (209 milhões de cabeças), o segundo maior consumidor (38,6 kg hab⁻¹ ano⁻¹) e o segundo maior exportador (1,9 milhões toneladas) de carne bovina do mundo, tendo abatido mais de 39 milhões de cabeças. Apesar do país ter sofrido crise econômica nos últimos 3 anos em decorrência da pandemia da Covid-19, inflacionando o preço da carne bovina, ainda se mantém entre os maiores produtores e exportadores de carne bovina do mundo. Em 2020, deteve o maior rebanho bovino do mundo com 374,8 milhões de cabeças e, em 2021, foram produzidas 61,2 milhões de toneladas de carne bovina (CICARNE, 2021; EMBRAPA, 2021b). De modo geral, a exportação de carne bovina representa 3% das exportações brasileiras, com faturamento de 6 bilhões de reais. Representa 6% do Produto Interno Bruto (PIB) ou 30% do PIB do Agronegócio, com

movimento superior a 400 bilhões de reais, que aumentou em quase 45% nos últimos 5 anos (EMBRAPA, 2020).

Para que o Brasil possa aproveitar o favorável cenário de crescimento da indústria de laticínios e de produtos cárneos, decorrente do aumento do consumo interno e da demanda externa, alguns desafios importantes como o aumento da qualidade e segurança dos produtos finais devem ser superados (MAPA, 2014). Um dos fatores que impede de atingir mercados mais exigentes é a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, como o leite, carne, ovos e mel (MAPA, 2014).

Os antimicrobianos, como as sulfonamidas (SAs), são agentes bacterianos sintéticos baratos, amplamente difundidos na medicina veterinária para prevenção e tratamento de doenças infecciosas e como suplementação alimentar para o crescimento animal, visando o aumento da produtividade agropecuária (FERNANDES et al., 2015; MAMANI, 2007). As SAs são resistentes às altas temperaturas (processo de pasteurização, ultra pasteurização, cozimento e fritura), e podem ser excretadas no leite e no tecido animal. Desta forma, a longa exposição humana dada pela ingestão contínua de alimentos contendo resíduos de SAs pode proporcionar sérios riscos à saúde (ALABURDA et al., 2007; DMITRIENKO et al., 2014; MACEDO, 2012; MARTINS et al., 2014; MONTANARO, 1998; RANG et al., 2016). O desenvolvimento de problemas cardíacos, disfunções hepáticas e digestivas e reações alérgicas, tais como dermatites, urticárias, rinites e asma brônquica são alguns dos efeitos adversos. Além disso, em casos mais graves, as SAs podem apresentar potencial carcinogênico, além de acarretar resistência microbiana pelo organismo (AGARWAL, 1992a; BRINKMANN, 2014; MONTANARO, 1998).

Diante da importância econômica do setor agropecuário no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desenvolveram programas para a fiscalização e o monitoramento de condições sanitárias que assegurem a segurança alimentar dos consumidores. O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) da ANVISA e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC Animal) do MAPA são responsáveis por verificar a eficácia dos autocontroles adotados pelo setor industrial e por avaliar resíduos de medicamentos veterinários em leites, carnes, pescados, ovos e mel disponíveis para exportação e consumo, evitando possíveis ameaças à saúde da população. A Instrução Normativa Nº 51, de 19 de dezembro de 2019 estabelece uma lista de limites máximos de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (MAPA, 2019). O LMR é a

máxima concentração de resíduos (expressa em $\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) aceitável em alimento e que não apresenta riscos para a saúde humana. Internacionalmente, o Conselho da Comunidade Européia estabelece o LMR em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDX) e sulfatiazol (STZ) permitidos em alimentos de origem animal, incluindo o leite, a carne e todos os tecidos-alvo (músculo, tecido adiposo, fígado e rim) (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1990). No Brasil, a competência para estabelecer o LMR em alimentos de origem animal é do Ministério da Saúde por meio da ANVISA, que estabelece o mesmo valor recomendado pela União Européia (ANVISA, 2003).

Em grande parte das análises químicas, o pré-tratamento de amostra é uma etapa muito importante da sequência analítica, sobretudo nas análises em que os analitos são encontrados em baixíssimas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$ a ng kg^{-1}). Nesta etapa, objetiva-se a eliminação dos interferentes, a extração e a pré-concentração dos analitos para detecção e quantificação de forma precisa (BURATO et al., 2020; FERREIRA et al., 2012; REZAEI et al., 2006). Para alcançar bons resultados, o método de preparo de amostra deve ser rápido, economicamente viável, eficiente, sensível e seletivo (OUYANG; PAWLISZYN, 2006; PŁOTKA-WASYLKA et al., 2015). Para análise de resíduos de SAs em alimentos de origem animal, o pré-tratamento de amostras geralmente emprega solventes orgânicos tóxicos, como: acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio ou acetona (DMITRIENKO et al., 2014; FERNANDES et al., 2015).

De acordo com a literatura, nos últimos anos tem-se optado pelo desenvolvimento de métodos de preparo de amostras miniaturizados, mais práticos, limpos e econômicos, nos quais são empregados pequenos volumes de amostras, solventes e reagentes (ABDALLAH et al., 2014; BANAN et al., 2022; BURATO et al., 2020; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; SANDRA; DAVID; VANHOENACKER, 2008). Os solventes orgânicos potencialmente tóxicos têm sido substituídos por solventes menos agressivos ecologicamente. De acordo com os princípios da Química Analítica Verde, a miniaturização do método de extração líquido-líquido (LLE) busca reduzir significativamente o volume de solventes nocivos ao meio ambiente e à saúde humana (ANDRUCH et al., 2013; KIAROSTAMI et al., 2014; KOCÚROVÁ et al., 2012; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SHI et al., 2014).

Arthur e Pawliszyn (1990) introduziram métodos miniaturizados, como a microextração em fase líquida (LPME), que utilizam poucos microlitros de solventes, evitando perdas nas etapas de extração e concentração da amostra e gerando resultados

quantitativos em baixas concentrações analíticas (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). Para aplicar metodologias mais eficientes em análises ambientais, biológicas e de alimentos, Rezaee et al., (2006) desenvolveram a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) – um método de preparo de amostras barato, rápido e eficiente para extração com alto potencial de aplicação direta em campo (ASENSIO-RAMOS et al., 2011; HERRERA-HERRERA et al., 2010; REZAEI et al., 2006; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; SARAJI; BOROUJENI, 2014). O método DLLME envolve a injeção de um pequeno volume de solvente extrator e dispersor na amostra com auxílio de uma microseringa, formando duas fases imiscíveis (fase aceptora: solvente extrator; fase doadora: fase aquosa) (BURATO et al., 2020; CRUZ-VERA et al., 2009; KABIR; LOCATELLI; ULUSOY, 2017). Na DLLME, altos fatores de enriquecimento podem ser obtidos visto que a razão entre os volumes da fase aceptora e doadora é da ordem de microlitros e mililitros, respectivamente (HUO et al., 2011; REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009).

Inúmeras metodologias baseadas em técnicas cromatográficas têm sido amplamente utilizadas para a detecção analítica. Estas técnicas são automatizadas, mais sensíveis e precisas e permitem a determinação simultânea de analitos em matrizes complexas. No entanto, esses métodos são onerosos e morosos pois empregam maiores quantidades de solventes, além de exigir experiência operacional do analista (ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014; BERIJANI et al., 2006; BITAS et al., 2018; KECHAGIA et al., 2017; LOPES et al., 2013; QUIGLEY; CUMMINS; CONNOLLY, 2016; SU et al., 2008).

A determinação de analitos com base em medidas por imagens digitais associada à procedimentos de extração miniaturizados tem sido atraente alternativa aos métodos convencionais. As medidas por imagens digitais baseiam-se na análise colorimétrica através da digitalização de imagens em aparelhos como smartphones e câmeras digitais. Em comparação com as câmeras digitais, os smartphones são leves, portáteis e amplamente utilizados como ferramentas de captura de imagens. A possibilidade de se utilizar aplicativos gratuitos nestes aparelhos permite a determinação analítica através da relação entre os dados de imagem obtidos e a concentração do analito (FAN et al., 2021; KWON; PARK, 2017; LIMA; NASCIMENTO; ROCHA, 2017; RATENI; DARIO; CAVALLO, 2017).

Uma vez que diversos resíduos de medicamentos veterinários utilizados na produção animal podem estar presentes em alimentos destinados ao consumo humano, o desenvolvimento de métodos miniaturizados e ecologicamente adequados tem se tornado cada vez mais importante (FERNANDES et al., 2015; KECHAGIA; SAMANIDOU, 2017;

MACEDO, 2012; QUIGLEY; CUMMINS; CONNOLLY, 2016; SANTOS, 2015). Além disso, as insuficientes publicações de trabalhos acadêmicos quanto análises de SAs em leite e carne bovina por meio de metodologias miniaturizadas, como as microextrações DLLME e sólido-líquido dispersiva (DSLME) assistidas por medidas de imagens digitais, incentivam o desenvolvimento de pesquisas inovadoras. Diante do exposto, este trabalho objetiva a aplicação das DLLME e DSLME como metodologias alternativas limpas, seguras e eficazes no preparo de amostras para a extração de SAs totais em amostras de leite e carne bovina.

2. OBJETIVOS

De modo alternativo aos métodos convencionais, este trabalho visou o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos, limpos, economicamente viáveis e eficientes para a extrações e determinações de sulfonamidas totais em amostras de leite e carne bovina.

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolvimento de método analítico baseado na DLLME e na DSLME para a extração e pré-concentração dos fármacos SMZ, SDX e STZ em amostras de leite e carne bovina provenientes do comércio local de Piracicaba, SP;
- Determinação e quantificação dos analitos através de medidas de imagens digitais pelo canal G do sistema RGB empregando aplicativo de celular gratuito instalado em smartphone;
- Comparação dos resultados obtidos com os limites máximos de resíduos de sulfonamidas totais em amostras de leite e carne bovina regulamentados pelo MAPA e ANVISA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leite e carne bovina

Estando entre os 5 produtos alimentícios mais comercializados, o leite é uma das commodities agropecuárias mais importantes do mundo, tanto em volume quanto em valor. Cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo, 10% da população mundial, depende diretamente da produção leiteira para subsistência. Deste montante, 600 milhões de pessoas vivem em 133 milhões de fazendas leiteiras ao redor do mundo (GDP, 2017).

Considerado um dos produtos mais versáteis da agroindústria alimentícia, o leite pode dar origem a diversos alimentos como queijo, requeijão, creme de leite, leite condensado, iogurtes, etc. Além da importância econômica como fonte de renda e sobrevivência para a população mundial, o leite e seus derivados também são fontes vitais de nutrientes. O leite é importante para o desenvolvimento humano por contribuir com significativas concentrações de micro e macronutrientes de alta qualidade, como cálcio, magnésio, selênio, proteínas, gorduras, lactose, aminoácidos, riboflavina e vitaminas A, B5, B12 e D, além de ser um produto de valor acessível à população (FAO, 2013; SIQUEIRA, 2019b).

Com faturamento de R\$ 68,7 bilhões de reais em 2018, a indústria brasileira de laticínios é o segundo segmento mais importante do setor industrial de alimentos no país, ultrapassando as indústrias de café, chá, cereais e açúcar, e ficando atrás apenas do setor de carne e derivados (ABIA, 2017). A produção nacional de leite bovino em 2018 atingiu a marca de 23,74 bilhões de litros, distribuídos regionalmente entre Sudeste (9,35 bilhões), Sul (8,93 bilhões), Centro-Oeste (3,07 bilhões), Nordeste (1,36 bilhões) e Norte (1,01 bilhão) (EMBRAPA, 2021a).

Em 2019, os dez maiores produtores mundiais de leite bovino produziram juntos 389,4 bilhões de litros, o que representa 55% do total de leite no mundo (SILVA, 2019). Em 2020, ano de início da pandemia da Covid-19, a produção mundial de leite bovino foi estimada em 532,3 bilhões de litros, 1,5% superior a 2019 (524,3 bilhões) e 6,7% superior a 2016 (498,6 bilhões) (EMBRAPA, 2021a).

O Brasil, por sua vez, ocupou o terceiro lugar de maior produtor de leite e derivados do mundo com volume de 34,8 bilhões de litros produzidos, representando 4,74% da produção mundial, com índice de produtividade média de 1.963,11 litros animal⁻¹ ano⁻¹ (SILVA, 2019). Segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil

possui mais de 1 milhão de produtores (predominantemente pequenas e médias propriedades de agricultores familiares). A indústria leiteira no país movimenta mais de R\$ 100 bilhões de reais ao ano, gerando mais de 4 milhões de empregos (MAPA, 2021).

O leite é o alimento mais procurado pela população (45% do total) e, dentre os produtos lácteos mais consumidos destacam-se lácteos frescos (leite, iogurte, leite fermentado, etc.), manteiga, queijos e leite em pó. De acordo com a Plataforma Global de Laticínios, são consumidos em média cerca de 44,44 litros de leite habitante⁻¹ ano⁻¹ no mundo (GDP, 2017).

No Brasil, a taxa de consumo de leite e derivados cresceu mais de 60% desde 1990, sendo o leite longa vida um dos produtos mais consumidos (ABLV, 2018). A Embrapa Gado de Leite estima que, em 2018, o brasileiro consumiu em média 166,4 litros de leite no ano, o que corresponde a 455 mL pessoa⁻¹ dia⁻¹ (ou 2 xícaras de leite pessoa⁻¹ dia⁻¹) (EMBRAPA, 2021a). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização para Alimentação e Agricultura (*Food and Agricultural Organization* – FAO) afirmam que, dado a divergência socioeconômica, cultural, disponibilidade de alimentos e hábitos alimentares, não é apropriado fornecer recomendações globais para alimentos individuais, exceto onde haja evidência científica suficiente para fazer tal recomendação (como é o caso das frutas e vegetais) (SIQUEIRA, 2019a). Apesar de não haver recomendação específica de consumo de leite e derivados para o Brasil, o consumo per capita brasileiro de leite e derivados (455 mL dia⁻¹) está alinhado ao valor recomendado pela Organização das Nações Unidas (ONU) e FAO para vários países do mundo (400 a 800 mL dia⁻¹ dependendo da faixa etária) (FAO, 2013).

No quarto trimestre de 2020, a aquisição de leite cru feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária (Federal, Estadual ou Municipal) foi de 6,75 bilhões de litros, equivalente a 1,1% de aumento em relação ao quarto trimestre de 2019, e de 4,0% em comparação com o trimestre imediatamente anterior. Apesar dos impactos econômicos causados pela pandemia da COVID-19, esse resultado representa um recorde, considerando todos os trimestres da série histórica da pesquisa, iniciada em 1997 (IBGE, 2020).

A carne bovina também é um alimento de grande importância econômica e nutricional. É uma das variedades de carne mais consumida na Europa, nas Américas e na Austrália, e muito importante na alimentação de populações da África, Ásia Oriental e Sudeste Asiático. Além de conter elevados teores de proteína de alta qualidade, a carne bovina é rica em ácidos graxos essenciais, em vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina,

niacina, ácido fólico e pantotênico, e vitaminas B6 e B12), em minerais (K, P, Mg, Fe e Zn) e em aminoácidos essenciais.

Em 2020, o Brasil deteve o maior rebanho bovino do mundo, representando 24,7% do rebanho mundial com 374,8 milhões de cabeças, seguido pela Índia, com 190 milhões de cabeças (EMBRAPA, 2021b). Segundo o Departamento de Agricultura Norte-Americano, em 2021, o rebanho mundial de bovinos cresceu 0,7% em relação a 2020, representando o maior patamar de crescimento desde 2009 (USDA, 2021).

Em relação à produção, de acordo com o Centro de Inteligência da Carne Bovina da Embrapa, atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina, tendo produzido o equivalente a 61,2 milhões de toneladas de carcaça de carne bovina em 2021, o que representa 16,8% do volume global produzido, e aumento de 1% em relação a 2020. No ranking mundial, o Brasil se mantém na segunda posição em volume global, situando-se entre os Estados Unidos (21,3%) e a União Européia (12,5%). Para 2022, estima-se que a produção brasileira de carne bovina possa ter crescimento de 4,6% em relação ao ano de 2021 (CICARNE, 2021).

Em termos de exportação, de acordo com a Secretaria de Comércio Exterior, do Ministério da Economia e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do MAPA, o Brasil foi o maior exportador de carne bovina do mundo em 2020, com 2,2 milhões de toneladas comercializadas, equivalentes a 8,48 bilhões de dólares (EMBRAPA, 2021b). Segundo o mais recente relatório “Pecuária e Aves: Mercados e comércio mundial”, elaborado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o prognóstico para 2022 é que o Brasil exporte 2,68 milhões de toneladas de carne bovina, movimentando receita de 10,33 bilhões de dólares. Caso se concretize, o volume exportado poderá ser o maior já realizado pelo Brasil, batendo o recorde de 2020 (USDA, 2021). Projeções da Organização para o Desenvolvimento da Cooperação Econômica prevê o aumento de 1,28% ao ano na produção mundial de carne bovina, atingindo 79,3 milhões de toneladas até 2027. Para o Brasil, o crescimento na produção tende a prevalecer, mantendo o país entre os principais produtores de carne bovina do mundo (OECD/FAO, 2020).

Os costumes e hábitos alimentares da população mundial tem mudado ao longo das décadas e, o consumo de carne bovina, por sua vez, tem ganhado cada vez mais espaço nas mesas dos consumidores. Apesar disto, o grande interesse do Brasil em se manter entre os cinco maiores produtores e exportadores mundiais de carne bovina, torna o produto interno mais caro e pouco acessível à população de média e baixa renda. Outro fator que influencia

diretamente no valor da carne bovina é a baixa incidência de chuvas dos últimos anos que tem causado aumento nos preços do milho e soja (usados também como suplementação animal) e dos defensivos e fertilizantes agrícolas. Com isso, a disponibilidade da carne no cardápio de grande parte das famílias brasileiras socioeconomicamente vulneráveis vem diminuindo; sobretudo para aquelas que têm enfrentado a elevada taxa de desemprego desde o início da pandemia.

Comparando com os últimos 50 anos, a quantidade de 34 milhões de toneladas de carne bovina consumidas por 3,7 bilhões de pessoas em 1970, foi para 59 milhões de toneladas em 2019, abastecendo 7,6 bilhões de habitantes. Em função do crescimento da população mundial que praticamente duplicou no mesmo período, percebe-se redução do consumo per capita (CICARNE, 2021). Nos últimos 3 anos em decorrência da pandemia da Covid-19, a redução no consumo se intensificou. Com queda de 2%, foram consumidos em 2021 no Brasil, 5,24 milhões de toneladas de carne bovina – o menor índice em 12 anos (MOTA, 2021). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento, o consumo individual de carne bovina em 2021 no Brasil foi de 26,5 kg hab⁻¹ – a menor quantidade em 25 anos. Em comparação com 2006, época em que o consumo médio foi de 42,8 kg hab⁻¹, o decréscimo chegou a 40% em 2021 (CONAB, 2021).

Com a retomada das atividades presenciais e a geração paulatina de novos empregos associadas à melhora do cenário econômico e financeiro do país devido ao controle epidemiológico da Covid-19, a previsão para 2022 é de que haja aumento de 1,1% no consumo interno de carne bovina, chegando a 7,14 milhões de toneladas, o que corresponderia em 73,2% do total da carne bovina produzida no país (USDA, 2021).

3.2. Antimicrobianos

Caracterizados como bacteriostáticos e/ou bactericidas, os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos que atuam sobre as bactérias inibindo a reprodução ou causando destruição (FERNANDES et al., 2015; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; RANG et al., 2016). Entre os variados tipos de antimicrobianos, destacam-se os quimioterápicos e os antibióticos. Conceitualmente, os quimioterápicos são oriundos de substâncias produzidas em laboratório e os antibióticos são produzidos parcial ou totalmente por seres vivos (grande parte por fungos do gênero *Streptomyces* e alguns do gênero *Penicillium* e *Cephalosporium*).

Após Paul Ehrlich, em 1910, ter sido o pioneiro a conjecturar que uma substância química poderia afetar a proliferação de microrganismos em concentrações inofensivas para o hospedeiro, Gerhard Domagk, em 1935, deu origem a nova classe de antibióticos sintéticos como as SAs, antimicrobianos bacteriostáticos utilizados como primeira classe contra infecções sistêmicas, marcando o início da era moderna da quimioterapia antimicrobiana (SANTOS, 2015).

Os antimicrobianos na medicina veterinária têm sido usados para (i) tratar infecções bacterianas (terapêutico), (ii) prevenir doenças causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático) e (iii) melhorar a taxa de crescimento ou conversão alimentar (promotores de crescimento). No entanto, muitas discussões no meio científico têm evidenciado o desenvolvimento de resistência bacteriana em decorrência do uso excessivo dessas substâncias e da presença de resíduos antimicrobianos em alimentos, oferecendo riscos toxicológicos e microbiológicos tanto para o animal quanto aos seres humanos (BEVIL, 1984; MONTANARO, 1998; STUMPF et al., 1999). O uso de antimicrobianos na cadeia produtiva animal para o tratamento de doenças infecciosas como mastites em gado leiteiro e a utilização de medicamentos na alimentação animal como suplemento de dietas, têm proporcionado a presença de resíduos de antimicrobianos no leite e na carne bovina.

Segundo o Decreto Nº 8.840, de 24 de agosto de 2016, os medicamentos veterinários são classificados como:

Toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suplementos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de ambiente e de equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, ou também os produtos destinados ao embelezamento dos animais. (BRASIL, 2016).

Os medicamentos veterinários são agentes antimicrobianos – popularmente chamados de antibióticos – mundialmente empregados tanto para a prevenção e tratamento de doenças como mastite, pneumonia, desenteria, artrite e infecções genitais e oftálmicas, quanto para melhorar a eficiência alimentar a fim de estimular a taxa de crescimento, controlar a taxa de reprodução e diminuir os índices de morbidez e mortalidade na produção animal

(DENOBILE; NASCIMENTO, 2004; SANTOS, 2015). Os fármacos usados na medicina veterinária são caracterizados de acordo com o mecanismo de ação exercendo ações profiláticas e terapêuticas como antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, fungicida e sedativa que, por consequência, resulta em rebanhos mais saudáveis, maior disponibilidade de alimentos de origem animal para o consumo humano, ganhos econômicos para os produtores e menor risco para saúde humana (MACEDO, 2012; SANTOS, 2015).

Entretanto, o uso inadequado e indiscriminado destas substâncias na pecuária (administração de medicamentos ilegais ou em doses superiores às recomendadas) pode levar ao aparecimento de resíduos de antibióticos nos alimentos em níveis inseguros à saúde humana. A longo prazo, a presença de medicamentos veterinários na dieta humana pode acarretar, efeitos adversos, como problemas cardíacos, disfunções hepáticas e digestivas e reações alérgicas como dermatites, urticárias, rinites e asma brônquica (MACEDO, 2012). As preocupações quanto à exposição referem-se principalmente ao potencial carcinogênico de alguns antibióticos, como as SAs (MONTANARO, 1998). Além disso, a utilização recorrente de antimicrobianos pode acarretar resistência microbiana tanto em animais, quanto em seres humanos, dificultando a ação terapêutica desses medicamentos (AGARWAL, 1992a; BRINKMANN, 2014; MONTANARO, 1998).

A segurança na qualidade de alimentos de origem animal como o leite e a carne bovina depende do controle e monitoramento de microrganismos patogênicos potencialmente capazes de transmitir infecções, e da fiscalização da presença de resíduos de medicamentos veterinários no produto final. Durante a criação animal, deve-se atentar com a administração correta dessas substâncias, pois o uso inadequado pode levar ao surgimento de resíduos antimicrobianos no leite e na carne que, além de serem nocivos à saúde humana a longo prazo, prejudica o processo industrial de seus derivados e, conseqüentemente, causando sérios danos econômicos para o país (DENOBILE; NASCIMENTO, 2004). Vale ressaltar que, em alimentos como o leite e derivados, os resíduos de medicamentos veterinários são difíceis de serem removidos, uma vez que os processos de pasteurização, fervura ou esterilização não são suficientes para eliminar tais substâncias (MONTANARO, 1998). Portanto, a regulamentação dos índices máximos permitidos de resíduos para cada alimento é imprescindível para o controle e atendimento às boas práticas veterinárias, certificando produtos seguros e de qualidade para o consumidor (MARTIN, 2015).

O campo do monitoramento e regulamentação de normas foi expandido em decorrência do processo de industrialização. A construção de centros de pesquisas laboratoriais voltados para saúde pública, permitiu o exercício da Vigilância Sanitária. A

crescente produção mundial e industrial de alimentos e medicamentos foi acompanhada de denúncias públicas cada vez mais recorrentes quanto ao uso excessivo de conservantes e à adulteração e falsificação de produtos, demonstrando o interesse popular em buscar medidas de proteção à saúde e na expansão da legislação regulamentadora (SANTOS, 2015).

No Brasil, a ANVISA e o MAPA dispõem de programas que prezam pela manutenção das boas práticas na produção e inspeção de produtos da cadeia produtiva animal disponíveis para consumo.

No intuito de promover a segurança dos alimentos de origem animal produzidos no país, a ANVISA, pela Resolução nº 253 de 16 de setembro de 2003, criou o PAMVet¹ para avaliar resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino, carne de frango, carne bovina, carne suína, pescado, ovos e mel disponíveis para o consumo, visando evitar possíveis danos à saúde da população (ANVISA, 2003). Os princípios ativos recomendados para avaliação segundo o PAMVet são: tetraciclina, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfamídeos, macrolídeos, quinolonas abamectina, doramectina e ivermectina, por serem amplamente empregados na medicina veterinária e por deixarem resíduos em alimentos, fornecendo risco potencial à saúde humana (MACEDO, 2012; MAMANI, 2007).

O MAPA, mediante a Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999, criou o PNCRC Animal² para verificar a eficácia dos autocontroles adotados pelo setor industrial de produtos de origem animal consumidos no Brasil e destinados à exportação (MAPA, 1999). A Instrução Normativa N.º 51, de 19 de dezembro de 2019 estabelece uma lista de LMR, ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (MAPA, 2019). Conforme a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, é proibido o processamento de alimentos de origem animal provenientes de animais que estejam sendo tratados com medicamentos veterinários, a fim de garantir que estes resíduos farmacológicos sejam inferiores aos níveis recomendados pela legislação nacional e internacional (MAPA, 2011).

O LMR é a máxima concentração de resíduos (expressa em mg kg^{-1} , $\mu\text{g kg}^{-1}$, mg L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$) legalmente permitida ou admissível em alimento, que não apresenta riscos toxicológicos à saúde humana, considerando a IDA (ANVISA, 2003). Internacionalmente, o Conselho da Comunidade Européia estabelece o LMR em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o

¹ Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal.

² Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal.

somatório de SMZ, SDX e STZ permitidos em alimentos de origem animal, como leite e carne proveniente de bovinos, ovinos e caprinos, incluindo todos os tecidos-alvo (músculo, tecido adiposo, fígado e rim) (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1990). No Brasil, a competência para estabelecer o LMR em alimentos de origem animal é do Ministério da Saúde por meio da ANVISA, que estabelece no país o mesmo valor recomendado pela União Européia (ANVISA, 2003).

Sintetizadas pela primeira vez em 1935 pelo microbiologista alemão Gerhard Domagk e conhecidas desde meados do século XX, as SAs, derivadas do ácido sulfanílico (ácido p-aminobenzenossulfônico), são um dos mais antigos fármacos sintéticos de baixo custo que integram o grupo de antimicrobianos bacteriostáticos amplamente utilizados na medicina veterinária – seja em formulação única ou sinergicamente com outros antibióticos (como tetraciclina, quinolonas, fluoroquinolonas e trimetoprim) (FERNANDES et al., 2015; MAMANI, 2007). A frequência de ocorrência das SAs em alimentos foi reportada 20%, enquanto outros antibióticos foram detectados nas seguintes proporções: fluoroquinolonas (19%), aminoglicosídeos (15%), fenicóis (15%), β -lactâmicos (15%), oxazolidinonas (8%) e tetraciclina (8%) (PASTOR-NAVARRO; MAQUIEIRA; PUCHADES, 2009).

As SAs atuam como agentes antimicrobianos bacteriostáticos de amplo espectro, com atividade quimioterápica contra variados tipos de protozoários e bactérias gram-positivas e gram-negativas, apesar da existência de cepas resistentes que não necessitam desta substância para o crescimento, reduzindo a eficiência nos tratamentos (MACEDO, 2012; NOGRADY; WEAVER, 2005). Estes fármacos possuem anel benzênico substituído por dois grupos orientados nas posições 1 e 4 (Figura 1).

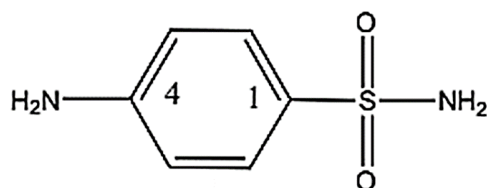


Figura 1. Estrutura molecular da sulfanilamida.
Fonte: Fernandes et al. (2015).

Farmacologicamente, as SAs podem proporcionar ação antimicrobiana, antiparasitária, antitumoral, antiviral, anticonvulsivante ou analgésica. As sulfas relacionadas às ações antimicrobianas possuem o grupamento $-\text{SO}_2-\text{NR}'\text{R}''$ diretamente ligado ao anel benzênico contendo o grupo amina substituinte na posição *para* (p-NH₂). A ligação do nitrogênio do grupo sulfonamídico (N₁) com núcleos aromáticos heterocíclicos resulta em

compostos altamente eficazes contra bactérias (MITSCHER; LEMKE; GENTRY, 2002). O grupo SO_2 age como receptor de elétrons, tornando o nitrogênio (N_1) parcialmente eletropositivo, conferindo caráter ácido ao hidrogênio. Tal comportamento relaciona-se à solubilidade das SAs e aos impactos no organismo, uma vez que quanto menor a acidez, menor a solubilidade em água, o que implica na elevada propensão de acúmulo no organismo (MITSCHER; LEMKE; GENTRY, 2002).

Todas as SAs são sólidos brancos ou levemente amarelados, inodoros e algumas têm sabor amargo. São pouco solúveis ou praticamente insolúveis em água. A solubilidade em ácidos e álcalis é condicionada pelas propriedades anfotéricas devido à presença do grupo amino aromático básico (pK_{a1} : 2 – 2,5) e do grupo amida, que contém um átomo de hidrogênio lábil com propriedades ácidas (pK_{a2} : 5 – 8). Em soluções básicas as SAs apresentam caráter ácido devido a presença do nitrogênio ácido (capaz de doar prótons) ligado ao grupo sulfóxido e, em soluções ácidas apresentam características básicas devido a presença de nitrogênio básico (capaz de receber prótons), ligado ao anel aromático (CATELANI, 2013). Contudo, as propriedades ácidas das SAs são mais pronunciadas do que as propriedades básicas (DMITRIENKO et al., 2014).

Ao serem administradas e inseridas no organismo animal ou humano, a inibição bacteriostática causada pelas SAs é decorrente da interrupção na reação bioquímica de síntese de ácido fólico e diidrofólico – vitaminas pertencentes ao complexo B, precursoras essenciais na síntese de ácidos nucleicos necessários à reprodução bacteriana. A síntese de ácido fólico e de ácidos nucleicos ocorre na presença do ácido p-aminobenzóico (PABA) que, por sua vez, é estruturalmente análogo às SAs devido às características estéricas e eletrônicas semelhantes. No organismo, as SAs atuam como antimicrobianos, bloqueando a síntese de ácido diidrofólico, impedindo a formação de ácido diidropteróico a partir de diidropteridina e PABA, que envolve a enzima *diidropteroato sintetase*. As SAs competem com o PABA, resultando na formação de análogos não funcionais de ácido fólico, inviabilizando a reprodução bacteriana (BARAN et al., 2011; FERNANDES et al., 2015; NOGRADY; WEAVER, 2005). Essas características do mecanismo conferem alta sensibilidade às SAs apenas para microrganismos que sintetizam seu próprio ácido diidrofólico. Microrganismos e células que utilizam o ácido diidrofólico como produto acabado são insensíveis às SAs (DMITRIENKO et al., 2014).

Os antimicrobianos sulfadiazina (SDZ) e sulfametoxazol (SMX) são as SAs mais importantes utilizadas na saúde humana no tratamento de infecções urinárias, otite, sinusites,

pneumonias e para pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência infectados por *Pneumocystis carinii* (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Além do uso na medicina humana, as SAs podem ser utilizadas na medicina veterinária na suplementação alimentar e no tratamento de doenças no gado leiteiro e de corte (DENOBILE; NASCIMENTO, 2004; MACEDO, 2012). Estes fármacos são agentes bacteriostáticos que, quando empregados em alta concentração, apresentam efeito bactericida e quimioterápica podendo causar graves reações adversas aos animais em fase de tratamento (RANG et al., 2016).

Em decorrência de má conduta na profilaxia e tratamento dos animais ou devido ao descumprimento dos tempos de espera antes do abate, vestígios significativos de SAs podem aparecer nos alimentos de origem animal. Os seres humanos acabam se tornando consumidores passivos desses medicamentos ao ingerir alimentos como carnes, laticínios, ovos e mel. No organismo, a absorção ocorre pelo trato respiratório e gastrointestinal, sendo o intestino delgado o principal centro de absorção. A incidência global de reações adversas decorrente da exposição prolongada quanto ao consumo de alimentos contaminados é de cerca de 5%. Em menos de 0,1% dos pacientes ocorre necrose local ou difusa do fígado. Em 1 a 2% dos indivíduos ocorre anorexia, náuseas e vômitos (ALABURDA et al., 2007; DMITRIENKO et al., 2014; MONTANARO, 1998). Contudo, longos períodos de exposição às SAs, podem causar sérios efeitos adversos à saúde humana, como resistência bacteriana, reações de hipersensibilidade com febre, mal-estar e prurido³, supressão da atividade enzimática, alteração da flora intestinal, distúrbios das vias urinárias (cristalúria⁴); distúrbios do sistema hematopoiético⁵; anemia hemolítica aguda; agranulocitose⁶; anemia aplástica⁷; e, em casos mais graves, há evidências de efeitos carcinogênicos (ALABURDA et al., 2007; DMITRIENKO et al., 2014; MARTINS et al., 2014; MONTANARO, 1998; RANG et al., 2016). Por esta razão, recomenda-se que as SAs não sejam administradas por gestantes e lactantes visto que estes fármacos podem permear a placenta e são secretados no leite (FERNANDES et al., 2015).

3.3. Desenvolvimento de procedimentos analíticos

³ sensação desconfortável e irritante que causa a vontade de coçar, podendo afetar qualquer parte do corpo.

⁴ causada pela presença de altas concentrações de minerais na urina, podendo se transformar em cristais.

⁵ sistema responsável pela produção das células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), composto pela medula óssea e órgãos linfoides.

⁶ doença hematológica caracterizada pela ausência ou redução da quantidade da principal célula de defesa contra infecções, os granulócitos.

⁷ doença da medula óssea em que o organismo deixa de produzir quantidade suficiente de hemácias, plaquetas e glóbulos brancos.

Em grande parte das análises químicas, sobretudo nas análises de resíduos antimicrobianos em matrizes complexas, em que os analitos são encontrados em baixíssimas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$ a ng kg^{-1}), a etapa de preparo de amostra é indispensável. Nesta etapa, a limpeza (clean-up), extração e concentração dos analitos, ajustes de condições analíticas e a eliminação dos interferentes são os principais objetivos almejados para promover a detecção e quantificação dos analitos de forma precisa e exata, sobretudo quando são empregados métodos miniaturizados (BURATO et al., 2020; FERREIRA et al., 2012; REZAEI et al., 2006). O preparo de amostras além ser considerado como a etapa mais demorada do processo analítico, gastando cerca de 80% do tempo total de análise, é também a mais cara, pois são consumidos grandes volumes de solvente orgânico. Esta etapa requer que o tratamento seja executado com máxima atenção e cuidado, pois é onde os maiores erros analíticos são cometidos (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). Idealmente, o método de preparo de amostra deve ser prático, economicamente viável e compatível com a faixa de detecção do instrumento de análise. Deve apresentar características analíticas desejadas, incluindo eficiência, seletividade e aplicabilidade para determinações simultâneas, além de obter extratos mais limpos e sem perda de analitos (OUYANG; PAWLISZYN, 2006; PŁOTKA-WASYLKA et al., 2015).

Segundo a literatura, algumas tendências atuais no preparo de amostras alimentícias incluem: equipamentos miniaturizados para amostragem e preparo de amostras; a diminuição da massa de amostra a ser analisada, a redução das quantidades ou exclusão dos solventes orgânicos utilizados; o desenvolvimento de esquemas para extração e pré-concentração simultâneas do maior número de analitos de uma única amostra; a redução do número de etapas de análise pela combinação dos processos de amostragem e tratamento da amostra; e o desenvolvimento de métodos automatizados de pré-concentração, aumentando o desempenho da análise (ABDALLAH et al., 2014; BANAN et al., 2022; BURATO et al., 2020; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; SANDRA; DAVID; VANHOENACKER, 2008).

Para análise de resíduos de SAs em amostras de carne, leite e ovos, o preparo de amostras comumente envolve a extração com solventes orgânicos, tais como: acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio ou acetona (FERNANDES et al., 2015). Muitas vezes a extração compreende outras etapas de pré-tratamento da amostra antes da determinação quantitativa. Alguns solventes, embora possam provocar a desnaturação das proteínas presentes no leite possibilitando a obtenção de extratos mais limpos, são considerados potencialmente tóxicos e nocivos à saúde e ao meio ambiente como benzeno,

ciclo-hexano, clorofórmio, diclorometano, hexano, tetracloreto de carbono, tetrahydrofurano, trietanolamina, tolueno, xileno, etc (DMITRIENKO et al., 2014; PRAT; HAYLER; WELLS, 2014). A dificuldade frequentemente enfrentada durante o isolamento e pré-concentração de SAs surge devido à baixa hidrofobicidade e dos requisitos na escolha das condições analíticas que extraíam as SAs sem alteração da estrutura química (DMITRIENKO et al., 2014). Com os avanços científicos e a notoriedade dos princípios da Química Analítica Verde, o desenvolvimento de metodologias que utilizam volume reduzido de solventes orgânicos ambientalmente corretos tem sido cada vez mais recorrente (DE MARCO et al., 2019). Alguns estudos reportam o uso de solventes como o 1-butanol e 1-undecanol que, em comparação com a maioria dos solventes, apresentam baixa toxicidade (LIMA; PAPAI; GAUBEUR, 2018; RODRÍGUEZ-CABO et al., 2011).

Deste modo, em atenção aos diversos resíduos de medicamentos veterinários utilizados na cadeia produtiva animal, aos baixos LMRs permitidos em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano, à complexidade inerente das matrizes alimentícias, e à potencial toxicidade dos solventes utilizados, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas miniaturizadas e ecologicamente corretas com sensibilidade e seletividade adequadas para identificar e quantificar a presença de antimicrobianos em diferentes matrizes.

Introduzida nos anos de 1980, a LLE é um método de preparo de amostra baseado na diferença de solubilidade de componentes presentes na amostra em dois solventes imiscíveis entre si. É considerada uma das mais antigas metodologias de extração tradicionalmente aceita para análises de contaminantes em amostras ambientais, biológicas e alimentícias, incluindo SAs em leite.

Além de promover a partição dos analitos de forma eficiente, os solventes usados em LLE, como acetonitrila, também podem desnaturar as proteínas presentes no leite, resultando em extratos mais limpos. O etanol e acetato de etila também são amplamente usados nestas extrações. Contudo, podem extrair grande quantidade de compostos lipofílicos e outros interferentes (PRESTES et al., 2013). A eficiência da extração está relacionada com o valor da constante de distribuição entre as fases, o qual pode ser aumentado pelo ajuste do pH, para prevenir a ionização de ácidos ou bases (SANTOS, 2015). Como desvantagem, consome grandes volumes de solventes orgânicos potencialmente tóxicos (> 100 mL), gerando ampla quantidade de resíduos, o que implica em maior custo analítico. Além disso, a LLE apresenta baixo potencial de automação, dificuldade de repetibilidade e reprodutibilidade devido às várias etapas envolvidas, acarretando a perda e contaminação do analito (AGARWAL, 1992b;

JANK et al., 2012; LOPES et al., 2013; MACEDO, 2012; MARTINS et al., 2012; RÜBENSAM et al., 2011; SILVA, 2013; TOALDO, 2011). Outros métodos para o isolamento de SAs de alimentos incluem a extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura (LLE-LPT), extração líquida pressurizada (PLE), microextração líquido-líquido dispersiva com líquidos iônicos assistida por ultrassom (UA-IL-DLLME), microextração em fase sólida (SPE), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (ANASTASSIADES et al., 2003; ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014; GAO et al., 2012; LOPES et al., 2011a, 2011b; LU; CHEN; LEE, 2007; YU et al., 2011).

Em 1990, com a busca pelo desenvolvimento de métodos de extração com mais vantagens ambientais, econômicas e analíticas (como eficiência e seletividade), a extração em fase sólida (SPE) foi proposta visto que menor volume de solvente é empregado (AGARWAL, 1992b, 1993; CARRASCO-CORREA et al., 2019). Baseada na cromatografia líquida clássica, a SPE é uma extração sólido-líquido que faz uso de sorventes descartáveis (cartucho - coluna de polipropileno) com alta afinidade para determinados analitos. É escolhida de acordo com o analito e matriz de estudo para remover os interferentes e, reter e concentrar os compostos da amostra líquida ou em solução (MACEDO, 2012; SANTOS, 2015). Após a amostra ser inserida na parte superior da coluna, pequeno vácuo faz com que a amostra percorra o cartucho, deixando os analitos de interesse aderidos à parede. Na sequência, os analitos são eluídos com pequeno volume de solvente orgânico, sendo esta a maior vantagem apresentada pela SPE (AGARWAL, 1993; CARRASCO-CORREA et al., 2019; PRESTES et al., 2013). Todavia, o tempo elevado de análise, a difícil automação, os custos elevados dos cartuchos (que não são reutilizáveis) e dos dispositivos comerciais multivias (manifolds) e, eventualmente, a dificuldade em selecionar o sorvente adequado para a aplicação desejada, são as principais desvantagens apresentadas pelo método (REZAEI et al., 2006).

Arthur e Pawliszyn (1990) desenvolveram a microextração em fase sólida (SPME). De modo miniaturizado, a SPME utiliza fibra de sílica fundida revestida com sorvente e incorporada na seringa cromatográfica para retenção dos analitos que posteriormente são identificados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC) (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). É um método rápido, simples, sensível e compatível com a separação e detecção do analito por diferentes sistemas, fornecendo resultados quantitativos mesmo em baixíssimas concentrações, evitando perdas nas etapas de extração e

concentração (OUYANG; PAWLISZYN, 2006). Contudo, o uso de fibras em SPME envolve alguns inconvenientes como: limitação da quantidade de fases estacionárias disponíveis comercialmente, possibilidade de decapagem de revestimentos devido a erros de manuseio; temperaturas máximas de operação na faixa entre 240 e 280 °C; são instáveis com solventes orgânicos devido ao inchaço e rompem facilmente (KARAGEORGOU et al., 2016; KECHAGIA; SAMANIDOU, 2017). Outras técnicas baseadas na SPE, tais como extração sortiva com barra de agitação, extração em fase sólida magnética e dispersão da matriz em fase sólida também são reportadas (HOU et al., 2013; HUANG; QIU; YUAN, 2009; IBARRA et al., 2014; LI et al., 2015; YU; HU, 2012; YU; MU; HU, 2012).

Aliados aos avanços analíticos proporcionados pelas técnicas miniaturizadas, os preceitos da Química Verde promoveram a busca por metodologias eficientes e com menor geração de resíduos tóxicos. Visando minimizar os impactos ambientais e riscos ocupacionais inerentes às atividades industriais e laboratoriais, Paul Anastas e John Warner postularam, em 1998, os 12 princípios da Química Verde, que objetivam reduzir ou eliminar o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos em processos e análises químicas, gerando pouco ou nenhum resíduo tóxico (ANASTAS; WARNER, 1998). Em 1999, Anastas discutiu a importância de aplicar os princípios da Química Verde no desenvolvimento de novas metodologias e técnicas analíticas ecologicamente corretas, dando origem à Química Analítica Verde (ANASTAS, 1999). Nesse contexto, Galuszka et al. (2013) adaptaram os 12 princípios da Química Verde (Tabela 1) propondo a minimização do consumo de energia elétrica, a gestão e manuseio adequado de resíduos analíticos gerados e maior segurança para os operadores, além da eliminação ou redução do uso de substâncias químicas nocivas à saúde e ao ambiente (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

Tabela 1. Os 12 Princípios da Química Analítica Verde.

Número	Princípio e descrição
1	Utilizar técnicas analíticas diretas buscando evitar a etapa de tratamento da amostra
2	Utilizar o menor tamanho e quantidade possível de amostras
3	Realizar análises <i>in situ</i>
4	Realizar a integração de processos e de operações analíticas buscando a economia de energia e redução no uso de reagentes
5	Utilizar métodos automatizados e miniaturizados
6	Evitar etapas de derivatizações químicas, minimizando o uso de reagentes adicionais e a geração de resíduos
7	Evitar a geração de grandes volumes de resíduos analíticos, manuseando-os corretamente quando necessário
8	Preferir a aplicação de métodos de múltiplos analitos frente aos métodos que analisam um analito de cada vez

- 9 Minimizar o uso de energia elétrica
 - 10 Preferir o uso de reagentes obtidos de fontes renováveis
 - 11 Descartar reagentes perigosos
 - 12 Aumentar a segurança dos operadores
-

Fonte: Galuszka et al. (2013).

Após os anos 2000, novos métodos de preparo de amostra têm sido desenvolvidos para superar as desvantagens significativas dos métodos tradicionais, atendendo os preceitos da Química Analítica Verde. A microextração em fase líquida (LPME) é um método simples, barato e adaptável com HPLC, GC e eletroforese capilar (CE), que foi introduzido para superar algumas desvantagens da LLE mediante a redução significativa do volume de solventes orgânicos empregados. Três variações da LPME têm sido exploradas: microextração de gota única (SDME); microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e DLLME. Em todas, poucos microlitros de solvente orgânico (fase receptora) são utilizados para extrair os analitos da matriz aquosa (fase doadora) (ASENSIO-RAMOS et al., 2011; MARTINS et al., 2012; MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; SARAJI; BOROUJENI; BIDGOLI, 2011).

No anseio em aplicar metodologias mais eficientes para análises ambientais, biológicas e alimentícias, Rezaee et al. (2006) desenvolveram a DLLME (REZAEI et al., 2006). Nos últimos anos, vários artigos de revisão têm sido publicados reportando o uso da DLLME para a extração de SAs em ampla variedade de matrizes (DENG et al., 2016; SANTANA; SANTANA; PEREIRA, 2018; YAZDANFAR; SHAMSIPUR; GHAMBARIAN, 2021). Este método envolve a formação de uma solução turva onde os analitos são particionados através da injeção de pequeno volume de solvente extrator e dispersor na amostra. Após a injeção, duas fases imiscíveis são formadas: a fase doadora (fase aquosa contendo o analito e o solvente dispersante) e a fase aceptora (fase orgânica contendo o solvente extrator e os analitos) (MARTINS et al., 2012; MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014). Especificamente, o solvente dispersor é miscível no solvente extrator e é empregado para dispersar o solvente extrator na solução aquosa, facilitando a extração dos analitos (Figura 2).

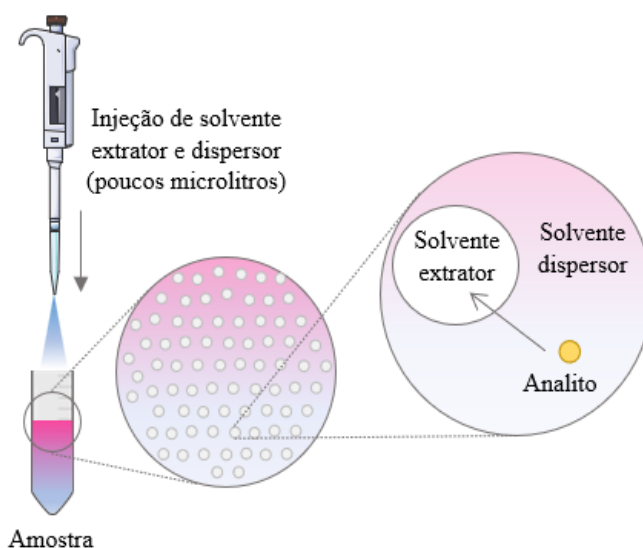


Figura 2. Diagrama simplificado demonstrando a injeção da mistura dos solventes, a dispersão do solvente extrator e a partição do analito entre a amostra e o solvente extrator.

Fonte: Adaptado de Martins et al. (2012).

Após agitação, a amostra é centrifugada para promover a separação de fases. Dependendo do tipo de solvente empregado, a fase de interesse pode se manter na parte superior ou inferior do tubo de ensaio. As principais vantagens da DLLME são a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, ótima recuperação e pouco tempo de extração. Alto fator de enriquecimento pode ser alcançado uma vez que a razão entre os volumes das fases aceptora e doadora é da ordem de microlitros e mililitros, respectivamente (HUO et al., 2011; REZAEI et al., 2008; ZANG et al., 2009). A DLLME supera as limitações da LLE, pois o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, devido à utilização de sistema ternário de solventes (amostra aquosa, solvente dispersor e extrator), o que torna a extração independente do tempo (MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014). Entretanto, alguns fatores podem afetar a eficiência desta microextração: o tipo de solvente extrator e dispersor, o volume de solvente extrator e dispersor, o pH da amostra, a força iônica e o tempo de extração. Alguns trabalhos também consideram a influência do tempo e velocidade de centrifugação (ASENSIO-RAMOS et al., 2011; HERRERA-HERRERA et al., 2010; HUO et al., 2011; REZAEI et al., 2006; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010; SARAJI; BOROUJENI, 2014; ZANG et al., 2009).

A DLLME pode ser classificada em duas categorias dependendo do tipo de solvente extrator empregado:

- Solventes extratores de alta densidade, em que a fase rica contendo os analitos é a sedimentada. Exemplo: IL-DLLME⁸ e LT-DLLME⁹ (CRUZ-VERA et al., 2009; GAO et al., 2012; LEONG; FUH; HUANG, 2014; WANG et al., 2013; XU et al., 2011; YAO; DU, 2020; ZHAO et al., 2011).
- Solventes de baixa densidade, em que a fase de interesse é o sobrenadante. Exemplos: DLLME-SFOD¹⁰, LDS-SD-DLLME¹¹, SA-DLLME¹², UA-DLLME¹³, VA-DLLME¹⁴ e MA-DLLME¹⁵ (AHMADI-JOUIBARI; FATTAHI; SHAMSIPUR, 2014; ALSHANA et al., 2013; BEHBAHANI et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2013, 2014; GUO; LEE, 2011; JIA et al., 2013; LEONG; FUH; HUANG, 2014; LEONG; HUANG, 2008; LIMA; PAPAI; GAUBEUR, 2018; SARAJI; BOROUJENI, 2014; WANG et al., 2013).

Gao et al. (2012) desenvolveram a microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico assistida por ultrassom (UA-IL-DLLME) com determinação em HPLC-DAD para a extração, separação e determinação de seis SAs em amostras de leite em pó infantil. Foram usados líquidos iônicos hidrofóbicos para extração, enquanto líquidos iônicos hidrofílicos como solventes dispersivos. A formação de soluções turvas, alcançadas mediante à gotas finas de [C₆MIM][PF₆], facilitou o procedimento de extração, promovendo recuperações entre 90 e 115% (GAO et al., 2012).

Arroyo-Manzanares et al. (2014) propuseram a determinação de nove SAs em leite usando DLLME e QuEChERS. A combinação destas metodologias foi empregada por serem alternativas ecologicamente corretas, utilizarem quantidade reduzida de solventes orgânicos e estarem de acordo com as novas tendências da Química Analítica Verde. Para a otimização, foram investigados diversos parâmetros como solvente extrator e dispersor (para DLLME) e valor de pH. Os métodos desenvolvidos foram precisos (DLLME: 3,0%–9,7%; e QuEChERS: 2,6%–9,2%) e aplicados na extração e determinação de SAs com recuperações entre 90,8–104,7% (DLLME) e 83,6–104,8% (QuEChERS) (ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014).

⁸ Ionic Liquid Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

⁹ Low Toxicity Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

¹⁰ Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on Solidification of a Floating Organic Drop.

¹¹ Low-Density-Solvent based on Solvent Demulsification.

¹² Surfactant-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

¹³ Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

¹⁴ Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

¹⁵ Microwave-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

Ao longo dos anos, tem se observado crescente interesse no estudo de sulfonamidas, sendo a última década a que alcançou o maior número de artigos publicados. Levantamento bibliográfico entre o período de 1990 a 2021, reportou aproximadamente 5.414 trabalhos propondo diferentes métodos analíticos para a detecção e/ou quantificação destes agentes antimicrobianos em matrizes como formulações farmacêuticas, fluídos biológicos (urina, sangue e plasma), produtos alimentícios e em amostras de água (rios, nascentes, aquíferos, esgotos, etc) (Figura 3). Deste montante, 3.628 trabalhos referem-se à estudos de SAs em alimentos de origem animal, sendo 1.121 para amostras de leite (31%) e 743 (20%) para carne. De modo menos frequente, as SAs também são estudadas em peixes (17%), frango (15%), ovos (9%) e mel (8%) (Figura 4).

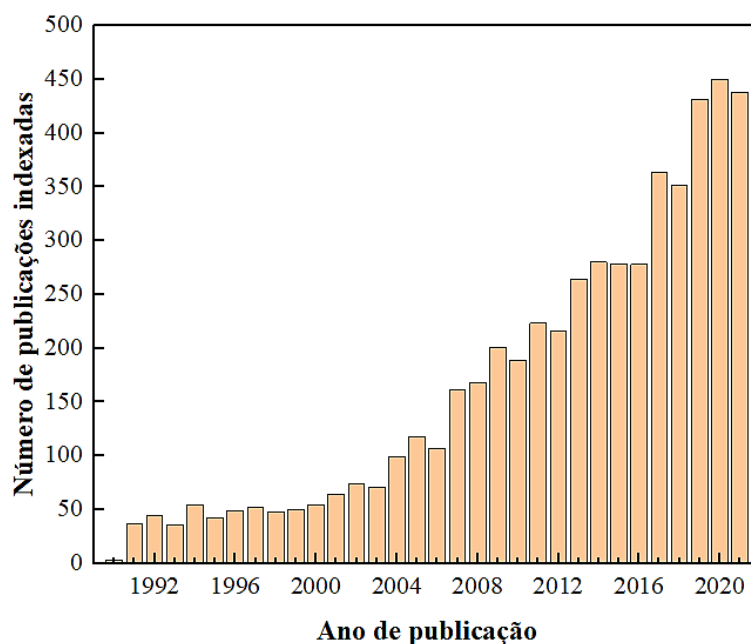


Figura 3. Publicações referentes aos métodos analíticos para a determinação de sulfonamidas entre 1990 e 2021.

Fonte: Informações retiradas da base de dados *Web of Science* (fevereiro 2022).

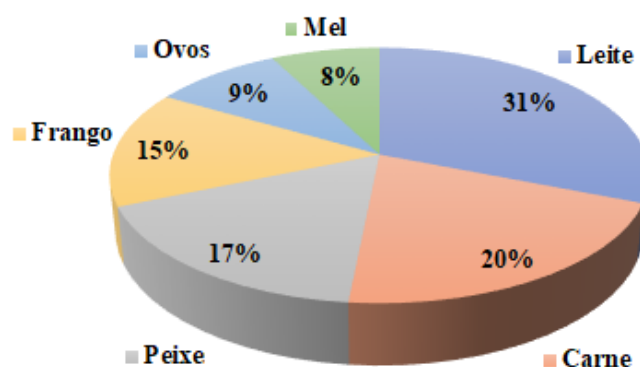


Figura 4. Tipos de alimentos de origem animal comumente analisados para sulfonamidas.
 Fonte: Informações retiradas da base de dados *Web of Science* (fevereiro 2022).

O monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes alimentícias tem sido feito mediante a aplicação de métodos microbiológicos e físico-químicos.

Para utilização de métodos microbiológicos são necessários equipamentos e substâncias caras e especializadas (reagentes, enzimas, leveduras). Os métodos microbiológicos mais aplicados são aqueles que incluem testes promotores ou inibidores microbiológicos e ensaios imunológicos e enzimáticos. Todavia, fornecem resultados limitados, indicando apenas a presença ou ausência de microrganismos, sem conseguir identificá-los e quantificá-los (FERNANDES et al., 2015; WANG et al., 2006). Outra desvantagem relacionada à limitação do método é a possibilidade de resultados falso-positivos. Por essa razão, estes testes são utilizados para triagens a fim de verificar possível presença de antimicrobianos que, em casos positivos, necessitam de testes confirmatórios de maior sensibilidade e especificidade para identificação e quantificação dos analitos (MACEDO, 2012).

Alternativamente, pode-se empregar métodos imunológicos e/ou enzimáticos para a detecção em 'tempo real' de SAs em matadouros, a partir da coleta de fluidos corporais (urina, bile e sangue) como marcadores para presença de resíduos em tecidos animais (NESTERENKO; NOKEL; EREMIN, 2009; PASTOR-NAVARRO; MAQUIEIRA; PUCHADES, 2009; TOLIKA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2010; ZHANG; WANG, 2009). Por se tratar de material biológico, os conjuntos reativos que se baseiam na competição por sítios de ligação em receptores de células bacterianas e que são específicos para várias classes de antibióticos, são sensíveis às variações térmicas e devem ser mantidos a

temperatura adequada a fim da conservação, evitando a ocorrência de resultados falso-positivos (FERNANDES et al., 2015).

Vários métodos físico-químicos reportados na literatura foram desenvolvidos e validados para a determinação de resíduos de SAs em diferentes matrizes como ambientais, biológicas ou alimentícias. As técnicas aplicadas incluem: eletroanalítica (ANDRADE et al., 2009; MSAGATI, 2002; SANTOS ANDRADE et al., 2010), absorção atômica (AYAD; AZIZ; KHEIR, 1983; MONTERO; GALLEGU; VALCÁRCEL, 1988), volumetria com medidas espectrofotométricas (AGARWAL; WALASH; BLAKE, 1972), potenciometria para determinação do ponto de equivalência (VERMA; GUPTA, 1982), cromatografia de camada delgada (TLC) (BIEGANOWSKA; PETRUCZYNIK, 1996), procedimentos em fluxo com detecção espectrofotométrica (EVGEN'EV; GARMONOV; SHAKIROVA, 2002; MEDINA; GARCÍA; DÍAZ, 2002) ou fluorimétrica (DIEZ et al., 2007; DÍEZ; SARABIA; ORTIZ, 2007).

Desde 1970 até os dias atuais, métodos baseados na fotometria, espectrofotometria, cromatografia gasosa, espectrometria de massa em tandem de cromatografia gasosa (GC-MS/MS), CE com detecção ultravioleta (CE-UV) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detecção ultravioleta (HPLC-UV), fluorescência (HPLC-FL) e espectrometria de massa (MS), são as técnicas mais difundidas para identificação e quantificação de resíduos de SAs em carne, leite, ovos e mel (AGARWAL, 1992a; LAGO; SANTANA, 2016; MOATS, 1986; SCHENCK; CALLERY, 1998; SCHWAIGER; KÖNIG; LESUEUR, 2018; SPIETELUN et al., 2013; YAZDANFAR; SHAMSIPUR; GHAMBARIAN, 2021). As dificuldades encontradas são os interferentes na matriz que atrapalham a separação cromatográfica, tornando necessário procedimentos de limpeza da amostra (clean up) e extração do analito antes da análise (AGARWAL, 1992b; ALABURDA et al., 2007; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; FELTRIN et al., 2007; SCHENCK; CALLERY, 1998).

A espectrofotometria é uma técnica mundialmente utilizada devido à simplicidade instrumental e operacional (WANG et al., 2006). Quanto à análise de SAs, grande parte dos trabalhos dispostos na literatura mencionam procedimento baseado na reação de diazotação, representada pelo acoplamento do analito com agente cromogênico, formando sal de diazônio que, ao ser acoplado às aminas aromáticas, resulta em produto colorido a ser medido espectrofotometricamente (NAGARAJA et al., 2002, 2007; RAMOS; ROMERO; ALVAREZ-COQUE, 1989). Alguns destes métodos apresentam desvantagens, como baixa sensibilidade e morosas etapas de manipulação de amostras (FERNANDES et al., 2015).

Limitada às análises qualitativas de SAs, a TLC pode ser utilizada para testes de triagem, assim como ocorre para os métodos microbiológicos (AGARWAL, 1992a; BIEGANOWSKA; PETRUCZYNIK, 1996).

Embora a GC seja uma técnica de elevada sensibilidade, a determinação de SAs é incomum visto que estas substâncias dificilmente são volatilizadas. Isto faz com que o processo de derivatização antecedente à análise cromatográfica seja executado. Como consequência, gasta-se mais tempo no preparo de amostra para obtenção de resultados analíticos confiáveis, o que, além de elevar o consumo de reagentes empregados, pode reduzir a taxa de recuperação dos analitos (AGARWAL, 1992a; FERNANDES et al., 2015; TOLIKA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2011).

O método por HPLC tem sido o mais difundido para determinação de SAs em carne, leite, ovos e mel (KECHAGIA et al., 2017; VARENINA et al., 2016). Habitualmente, a separação dos analitos é realizada em modo reverso, utilizando colunas contendo sílica funcionalizada às cadeias carbônicas C₁₈, C₈ ou C₄ (FURUSAWA, 2003; MAUDENS; ZHANG; LAMBERT, 2004; WANG et al., 2006). Para a fase móvel, diferentes misturas de solventes, tais como acetonitrila – água; metanol – água ou misturas ternárias de acetonitrila – metanol – água, podem ser empregadas. A fim de melhorar a separação cromatográfica podem ser adicionados acetato ou dodecil sulfato de sódio (SDS) (FURUSAWA; KISHIDA, 2001, 2003). Considerando que a retenção das SAs depende da polaridade da fase móvel e da ionização destes compostos, ajuste do pH da fase móvel em 4,4 torna-se imprescindível para separação eficiente, visto que todas as SAs, com exceção da sulfanilamida, apresentam excelente afinidade com a fase estacionária. A maior dificuldade encontrada em cromatografia decorre da complexidade da matriz, pois podem estar contidos diversos compostos que podem causar interferência nas medidas dos sinais analíticos cromatográficos. Com isso, exige-se que etapas de extração do analito e limpeza de amostra sejam realizadas (AGARWAL, 1992a; SCHENCK; CALLERY, 1998). Detectores espectrofotométricos como ultravioleta e arranjo de diodos (DAD) são os comumente usados em HPLC na determinação de SAs, além dos detectores de fluorescência, que requerem a derivatização química para a análise, e dos detectores de espectrometria de massas (AGARWAL, 1992a; CHUNG et al., 2009; FELTRIN et al., 2007; IBARRA et al., 2014; YU; HU, 2012).

A eletroforese capilar tem-se tornado alternativa promissora para a separação e identificação de ampla variedade de amostras, incluindo as SAs, em virtude da alta resolução, alta eficiência, rapidez e pequeno consumo de amostras e solventes, frente à cromatografia

líquida. No entanto, a separação é controlada pelo ajuste do pH, que deve ser otimizado para adequada separação (ALSHANA et al., 2013; DAI et al., 2017; TUBAON; HADDAD; QUIRINO, 2014; WEN et al., 2011).

Várias metodologias baseadas em técnicas cromatográficas têm sido amplamente divulgadas para a detecção de analitos orgânicos e inorgânicos em diferentes matrizes alimentícias, ambientais e biológicas. Estas técnicas de separação são automatizadas, mais sensíveis, precisas e permitem a determinação simultânea de diferentes substâncias. No entanto, são custosas e demoradas, além de empregarem mais solventes para eluir os analitos e exigirem conhecimentos técnicos e específicos do operador (ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014; BITAS et al., 2018; KECHAGIA et al., 2017; LOPES et al., 2013; QUIGLEY; CUMMINS; CONNOLLY, 2016).

Como alternativa aos métodos cromatográficos convencionais, a determinação analítica baseada em medidas de imagens digitais combinada com procedimentos de extração mais simples, baratos e limpos tem sido estratégia cada vez mais viável e atraente para garantir a segurança alimentar e o controle de qualidade. Com exceção das técnicas cromatográficas e espectrométricas (consideradas clássicas), foi realizado levantamento bibliográfico sobre as técnicas de determinação analítica usadas para análise de SAs (Figura 5). Menos de 100 trabalhos reportaram o uso das técnicas de determinação de SAs por TLC e análise por injeção em fluxo (FIA); e apenas 12 trabalhos mencionaram o emprego de medidas de imagens digitais para análises de sulfonamidas em alimentos.

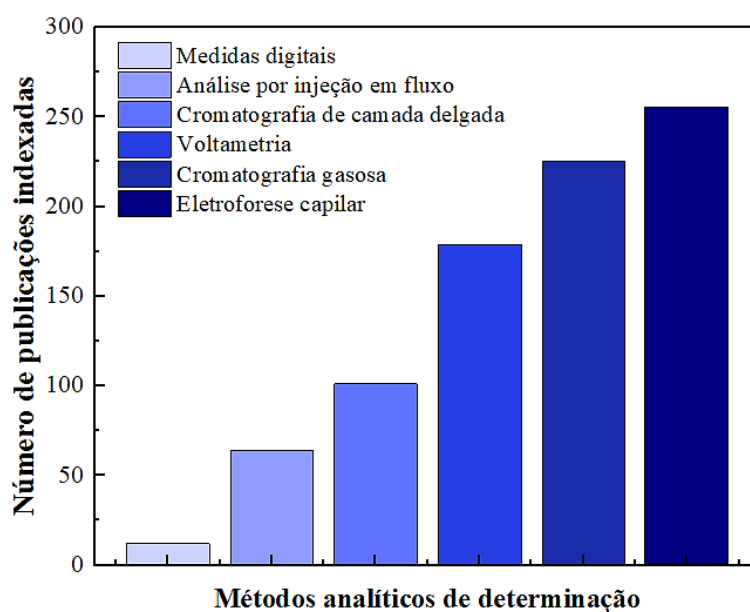


Figura 5. Publicações sobre métodos de determinação de sulfonamidas em função da técnica analítica.

Fonte: Informações retiradas da base de dados *Web of Science* (fevereiro 2022).

As medidas digitais referem-se à análise colorimétrica baseado na digitalização de imagens coletadas por ferramentas de aquisição de imagens, como telefones celulares, câmeras digitais, webcams, scanners, etc. Comparados às câmeras digitais, os smartphones são leves, portáteis e amplamente utilizados como ferramentas de captura de imagens devido ao rápido aumento de uso, notável melhoria nas funções da câmera e amplo uso de aplicativos gratuitos (FAN et al., 2021; KWON; PARK, 2017; LIMA et al., 2020; LIMA; NASCIMENTO; ROCHA, 2017; RATENI; DARIO; CAVALLO, 2017; SOARES; ROCHA, 2021).

Em relação à determinação analítica, é possível construir relação entre os dados de imagem obtidos e a concentração do analito, e os resultados podem ser medidos por meio de aplicativos gratuitos e personalizados instalados em smartphones (LIMA et al., 2020).

Especificamente, diferentes sistemas de cores são usados para definir o espaço de coordenadas tridimensional onde cada cor é representada por um único ponto. Os sistemas comumente usados incluem RGB, CMYK, XYZ e HSV. O analisador digital de imagens para “medição de cores” é utilizado para transformar as informações (cores) em valores numéricos que podem ser tratados como informações analíticas. A medida colorimétrica pode ser realizada usando vários softwares de análise de imagem ou aplicativos móveis baseados nos modelos de cores mencionados acima (FAN et al., 2021).

Recentemente, método alternativo para detecção de adulteração em leite por diluição a partir da determinação do teor de proteína foi proposto por Silva & Rocha (2020). O método envolveu a precipitação de proteínas pelo efeito salting-out do sulfato de cobre e a adsorção proporcional de Cu(II) no precipitado. Medidas fotométricas da quantidade restante de Cu(II) por colorimetria digital baseada em smartphone foram realizadas para determinar o teor de proteína. Neste estudo, foi possível analisar 32 amostras por hora, demonstrando alta frequência analítica (SILVA; ROCHA, 2020).

Para a determinação de formaldeído em leite, Silva & Rocha (2021) também propuseram novo método, mais rápido, mais ecológico, portátil e de baixo custo utilizando colorimetria de imagem digital assistido por smartphone, onde o produto formado na reação com o reagente de Schiff foi medido digitalmente. As imagens obtidas foram convertidas em valores de RGB através de aplicativo gratuito (Color Grab®). Todo o procedimento levou cerca de 40 minutos para ser realizado, o que demonstra a agilidade e praticidade do método proposto (SILVA; GONÇALVES; ROCHA, 2021).

Lima et al. (2020) propuseram a detecção de peróxido de hidrogênio como adulterante do leite usando reação colorimétrica e fotometria baseada em smartphone. O procedimento baseou-se na oxidação do analito de ferro(II) seguida da formação de complexo vermelho de ferro(III)-tiocianato. O meio ácido necessário para a formação do complexo serviu como solução de precipitação de proteínas, enquanto as imagens digitais foram obtidas diretamente em microtubos descartáveis sob condições de iluminação controlada, sem pré-tratamento da amostra. A determinação do adulterante levou cerca de 2 minutos, gerando apenas 350 µL de resíduos por determinação, o que demonstra a vantagem da técnica (LIMA et al., 2020).

As medidas por imagens digitais são alternativas viáveis, baratas, simples e rápidas que vêm sendo evidenciadas em pesquisas na determinação de analitos a partir de matrizes complexas. Embora menos sensíveis que as técnicas cromatográficas, as medidas digitais também apresentam alta sensibilidade atingindo baixos limites de detecção e alta reprodutibilidade, possibilitando a medida de múltiplas amostras em curto tempo (ACEVEDO et al., 2018; BURATO et al., 2020; LIMA et al., 2020; SILVA; GONÇALVES; ROCHA, 2021; SILVA; ROCHA, 2020).

Diante dos diversos resíduos de medicamentos veterinários utilizados na agropecuária, dos baixos limites máximos de resíduos permitidos em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano, da complexidade inerente das matrizes alimentícias, e do potencial toxicológico dos solventes utilizados nas extrações, tem se tornado cada vez mais importante o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas miniaturizadas e ecologicamente corretas com sensibilidade e seletividade adequadas para identificar e quantificar a presença destes contaminantes. O interesse mundial na área da Química Analítica Verde e as escassas literaturas tangentes ao emprego das microextrações líquido-líquido e sólido na determinação de SAs em produtos de origem animal por meio de medidas digitais, incentivam novos estudos voltados a aplicação deste método.

Deste modo, os trabalhos desenvolvidos nesta tese de doutorado buscaram metodologias alternativas limpas, seguras e eficientes no preparo de amostras baseados nas microextrações líquido-líquido dispersiva e sólido-líquido dispersiva assistidas por medidas de imagens digitais para extração e determinação de SAs totais em amostras de leite e carne bovina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

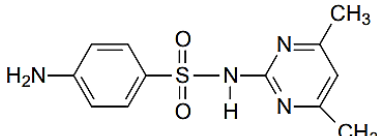
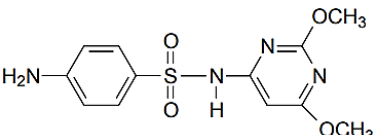
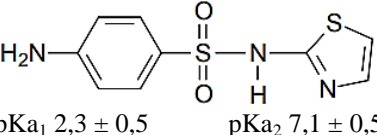
4.1. Amostras

Amostras de leite bovino de diferentes fabricantes (desnatado, semidesnatado, sem lactose, integral UHT - *Ultra-high Temperature*, pasteurizado, e em pó) e, amostras de carne bovina moída foram adquiridas no comércio local de Piracicaba, SP. As amostras foram particionadas e congeladas em freezer convencional (doméstico) para uso posterior.

4.2. Analitos

As sulfonamidas estudadas neste trabalho, sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfatiazol (Tabela 2), são as principais recomendadas pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal e pelo Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal para monitoramento em alimentos de origem animal.

Tabela 2. Sulfonamidas recomendadas para monitoramento segundo MAPA e ANVISA.

Composto	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (g L ⁻¹ , 25 °C)
Sulfametazina	 <p>pKa₁ 2,2 ± 0,2 pKa₂ 7,0 ± 0,5</p>	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,33	0,23
Sulfadimetoxina	 <p>pKa₁ 2,4 ± 0,5 pKa₂ 6,0 ± 0,5</p>	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310,33	0,28
Sulfatiazol	 <p>pKa₁ 2,3 ± 0,5 pKa₂ 7,1 ± 0,5</p>	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255,32	0,92

Fonte: Lago C. L. et al. (2018); Wishart, D. S. et al. (2018).

4.3. Derivatização química

A reação colorimétrica empregada para a determinação de SAs totais em amostras de leite e carne foi baseada na reação de formação do sal imino ($\lambda=560$ nm) decorrente da condensação entre o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio das SAs com o acceptor de elétrons do cromóforo p-DAC (4-dimetilaminocinamaldeído) em meio ácido na presença de surfactante (Figura 6) (FERNANDES et al., 2015; SAEED; HAQUE; QURESHI, 1993).

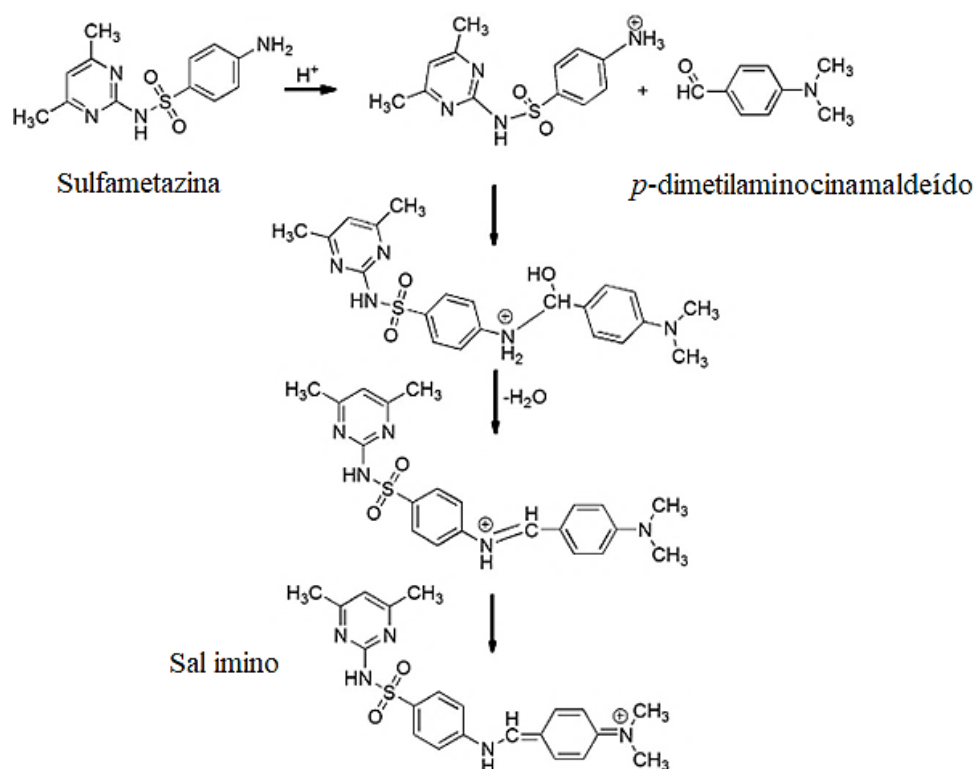


Figura 6. Reação entre sulfametazina e p-DAC em meio ácido.
Fonte: Fernandes et al. (2015).

4.4. Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas a partir de água deionizada ultrapura ($18 \mu S \text{ cm}^{-1}$ a $25^\circ C$) (Merck Millipore, modelo: Synergy® Water Purification System).

As soluções-padrão de sulfonamidas totais (300 mg L^{-1}) contendo SMZ, SDX e STZ foram preparadas dissolvendo 10 mg de cada sulfonamida em 100 mL de água deionizada ultrapura.

Solução de ácido tricloroacético (TCA $0,30 \text{ mol L}^{-1}$) foi utilizada na etapa de clean-up das amostras de leite para desnaturação e precipitação das proteínas. Para carne, a etapa de clean-up não foi necessária.

Para a etapa de derivatização química, foi utilizada solução-reagente diferente para cada tipo de amostra (denominado de reagente A para leite e reagente B para carne).

A solução-reagente A foi preparada pela mistura de 33 mg de p-DAC e 642 µL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado em 100 mL de água deionizada ultrapura.

A solução-reagente B foi preparada pela mistura de 19 mg de p-DAC, 360 µL HNO₃ e 431 mg de dodecil sulfato de sódio em 10 mL de água deionizada ultrapura.

As soluções de surfactante utilizadas foram preparadas individualmente dissolvendo-os em 10 mL de água deionizada ultrapura: dodecil sulfato de sódio (SDS, 0,23 g), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, 0,29 g), brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB, 0,25 g), brometo de dodecildimetilamônio (DDAB, 0,32 g), dioctil sulfosuccinato de sódio (AOT, 0,35 g) e sal interno de 3-(decildimetilamônio) propanossulfonato (SB3-10, 0,25 g).

Os solventes de extração avaliados foram 1-butanol, 1-octanol, 1-decanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, acetonitrila, etanol e metanol.

As soluções dos íons concomitantes Ca²⁺, Fe(III), K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺ e Zn²⁺ (1000 µg L⁻¹) foram preparadas pesando 25 mg e dissolvendo em 25 mL de água deionizada ultrapura.

4.5. Equipamentos e acessórios

Os aparelhos avaliados como modos de agitação foram: vórtex (Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, EUA; modelo SI-0266), banho ultrassônico (Quimis, SP, Brasil; modelo Q335D2) e mesa agitadora orbital (Quimis, SP, Brasil; modelo Q225M).

Para acelerar a separação de fases foram empregadas centrífuga com rotação variável (Quimis, SP, Brasil; modelo Q222TM2) ou mini centrífuga com rotação fixa (6000 rpm) (Crystal Technology & Industries, Inc., Addison, TX, EUA; modelo: MLX-106).

A determinação das SAs totais em ambas as amostras foi realizada por medidas de imagens digitais por meio do canal G (green - verde) do sistema RGB utilizando aplicativo gratuito Color Grab® (Loo-matix®, version 3.6.1, 2017) instalado em smartphone.

Para amostras de leite, foi empregado o smartphone Asus ZenFone (modelo ZB500KL), equipado com câmera de 13 megapixels e resolução de 4160 x 3120 pixels.

Para amostras de carne, foi utilizado o smartphone Moto X Force, modelo XT1580 equipado com câmera de 21 megapixels e resolução de 1440 x 2560 pixels.

Caixa de isopor (11 cm de altura, 8 cm de largura e 14 cm de profundidade) foi adaptada com aberturas para inserção dos tubos Falcon® de 15 mL (leite) e microtubos Eppendorf® (carne) a distância de 10,5 cm da câmera do smartphone. As medidas digitais foram realizadas no centro da região de interesse (Figura 7).

Lâmpada com 30 LEDs SMD de alto brilho, 1,5 W, 1,3 V alimentado por bateria de lítio (Kian, São Gonçalo, RJ, Brasil) foi acoplada à parte inferior da caixa para manter a iluminação constante durante as medidas fotométricas.

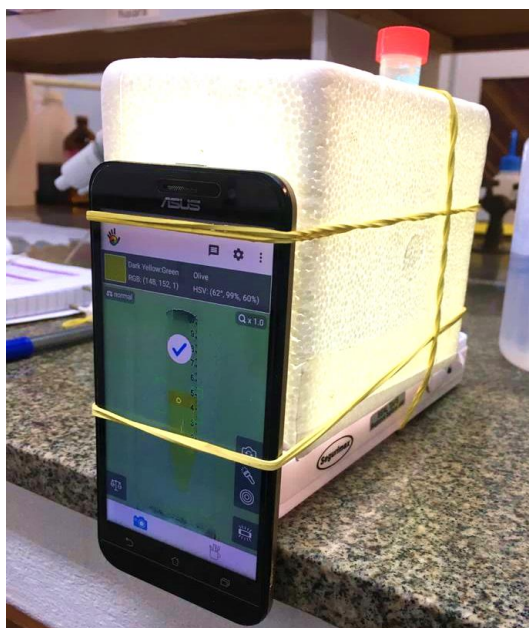


Figura 7. Suporte adaptado para medidas de imagens digitais.

A fim de validar os resultados obtidos pela metodologia colorimétrica desenvolvida, a detecção das SAs totais em amostras de leite bovino foi realizada via HPLC-UV (cromatógrafo AGILENT, modelo 1100 Series, Detector VWD). Para a separação dos analitos, realizada no comprimento de onda com absorção máxima em 265 nm, foi usada coluna C18 (AGILENT Eclipse XDB, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m tamanho de partícula), a partir da injeção de 100 μ L de amostra. Como fase móvel, foi empregada acetonitrila (solvente A) e solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) (solvente B) com vazão de 1,00 mL min⁻¹ (GUO et al., 2012).

4.6. Procedimento experimental

4.6.1. Preparo de amostra de leite

Em tubo tipo Falcon®, 1,0 mL de TCA ($0,30 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados em 500 μL de leite. As amostras foram agitadas em mesa agitadora orbital por 5 minutos a 200 rpm e centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm. O soro sobrenadante contendo os analitos foi retirado e transferido com o auxílio de micropipeta para outro tubo contendo os demais reagentes necessários às etapas de extração e pré-concentração.

4.6.2. Extração e pré-concentração de sulfonamidas das amostras de leite bovino

Após limpeza da amostra, 500 μL de soro foi transferido para tubo contendo 2,25 mL da solução-reagente A, 500 μL de SDS ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$) e 500 μL de 1-butanol (Figura 8) (Etapa 1). O tubo foi agitado em vórtex sob alta velocidade por 5 minutos (Etapa 2) e centrifugado por 17 min e 30 seg a 4750 rpm (Etapa 3). Em seguida, as amostras foram submetidas às medidas por imagens digitais para determinação das SAs no canal G do sistema RGB (Etapa 4). Os sinais de reflectância foram coletados por meio do aplicativo gratuito Color Grab®.

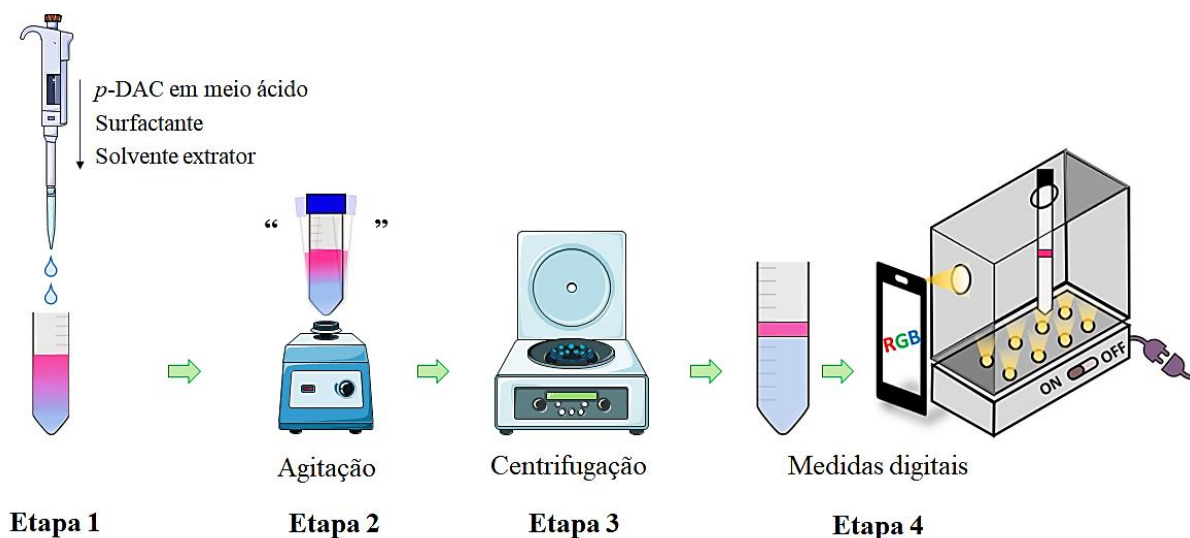


Figura 8. Etapas envolvidas no procedimento de extração e pré-concentração de sulfonamidas totais em amostras de leite bovino.

4.6.3. Extração e pré-concentração de sulfonamidas das amostras de carne bovina

Sem a necessidade de limpeza prévia, as amostras de carne moída foram pesadas (750 mg) e inseridas em microtubo (Eppendorf®) (Figura 9, Etapa 1), seguida da adição de

275 μL de 1-butanol (Etapa 2). Os microtubos foram agitados em mesa agitadora orbital por 13 minutos a 200 rpm (Etapa 3) e centrifugados em mini centrífuga com rotação fixa por 13 minutos e 6000 rpm (Etapa 4). Em seguida, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo contendo 60 μL da solução-reagente B (Etapa 5). As amostras foram levemente homogeneizadas à mão para promover a reação colorimétrica e centrifugadas por 1 min para separação de fases. Por fim, as amostras foram submetidas às medidas por imagens digitais (Etapa 6).

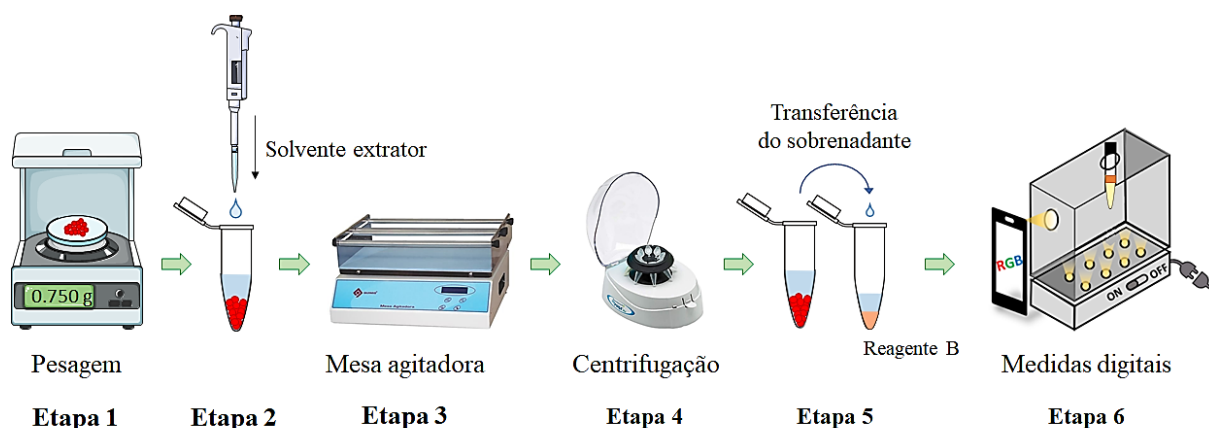


Figura 9. Etapas envolvidas no procedimento de extração e pré-concentração de sulfonamidas totais em amostras de carne bovina.

4.6.4. Método de referência

Após o preparo da amostra de leite, conforme descrito no item 4.6.1, foram adicionados 200 μL de Triton X-114 5,0% (m/v) em 1,00 mL do soro para extração em ponto nuvem (NASCIMENTO; ROCHA; ROCHA, 2015). A mistura foi aquecida em banho Dubnoff a 50 °C por 10 minutos para induzir o ponto de nuvem e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm para separação de fases. O pH do sobrenadante foi ajustado entre 4,0–4,5 antes da injeção de 100 μL no HPLC-UV.

A eluição dos analitos foi realizada em modo gradiente da seguinte forma: a concentração inicial de A de 15% aumentou linearmente para 20% ao longo de 9 minutos e, em seguida, para 40% em 18 minutos. Ao atingir 40%, a concentração permaneceu constante por 4 minutos e foi gradualmente reduzida a condição inicial entre 22 e 25 minutos de eluição. As medidas foram baseadas na somatória das áreas dos picos cromatográficos das SAs em 265 nm (GUO et al., 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Microextração líquido-líquido dispersiva de sulfonamidas totais em leite bovino

5.1.1. Otimização dos parâmetros físico-químicos

Uma vez que o método proposto é baseado na reação de condensação, conforme Figura 6, fez-se necessário avaliar a melhor condição (tipo e concentração de ácido) necessária para garantir a protonação do grupo amino das sulfonamidas e para posterior reação de condensação com o grupo carbonila do cromóforo p-DAC, resultando na formação do sal imino. Foram estudadas diferentes concentrações finais de ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO₃). Os sinais analíticos mensurados foram tratados e descontados do branco analítico (Figura 10). As condições experimentais químicas e físicas empregadas foram: 2,00 mL de p-DAC (2,85 mmol L⁻¹), 500 µL de SDS (0,08 mol L⁻¹), 1,00 mL de leite enriquecido (4000 µg L⁻¹ de SAs), 1,00 mL de 1-butanol, vórtex (5 min) e centrifugação (15 min a 4000 rpm).

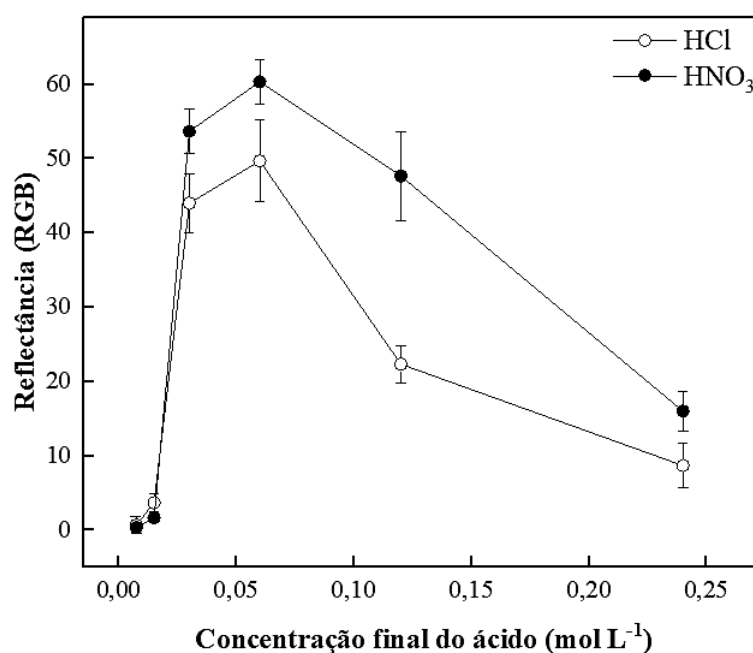


Figura 10. Efeito da concentração de ácido na reação colorimétrica de SAs com p-DAC em amostras de leite bovino.

Nota: Refletância média (n=3) obtida por medidas digitais (canal G, do sistema RGB) em diferentes concentrações finais de HCl (-○-) e HNO₃ (-●-).

Em geral, as sulfonamidas são completamente protonadas em pH 2,0 devido ao pKa₁ (2 a 2,5) e ao pKa₂ (5 a 8). Deste modo, foi avaliada a melhor condição que favorece a reação

de derivatização química para formação do sal imino na faixa de 0,0075 a 0,24 mol L⁻¹ (Figura 10), a melhor resposta analítica foi observada para HNO₃ na concentração final de 0,06 mol L⁻¹ garantindo a protonação das SAs. Acima desta concentração ácida, a formação do sal imino foi desfavorecida, afetando o sinal analítico.

Três surfactantes catiônicos (CTAB, DTAB e DDAB), dois aniônicos (AOT e SDS) e um zwitteriônico (SB3-10) foram investigados como solvente dispersor no procedimento proposto, conforme Figura 11.

As condições experimentais empregadas foram: 2,00 mL de p-DAC (2,85 mmol L⁻¹), 500 µL HNO₃ (0,60 mol L⁻¹), 500 µL de surfactante, 1,00 mL de leite enriquecido (1000 µg L⁻¹) e 1,00 mL de 1-butanol. Os parâmetros físicos empregados nos experimentos foram: vórtex (5 min) e centrifugação (15 min a 4000 rpm).

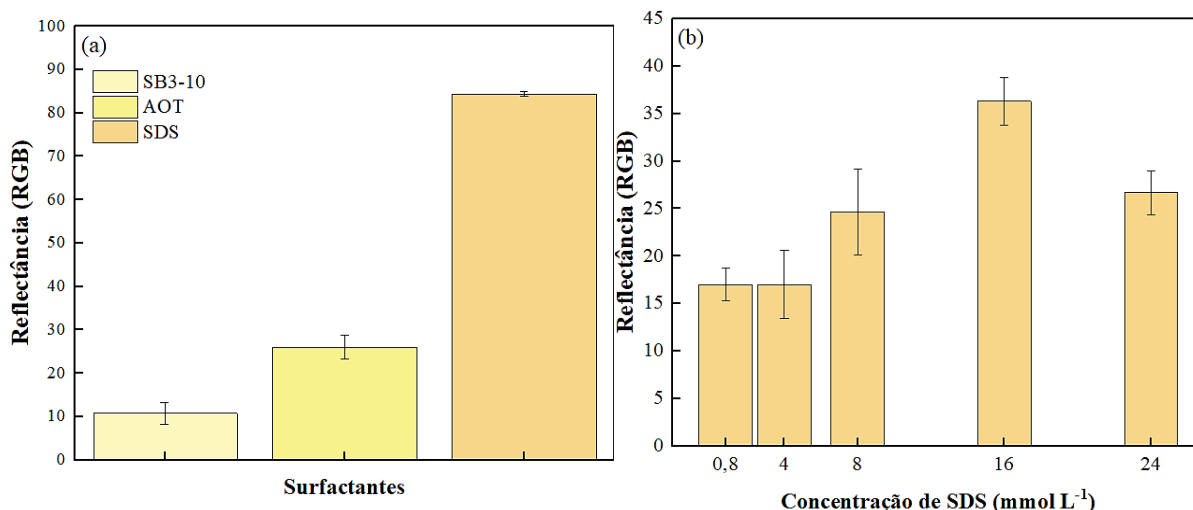


Figura 11. Efeito do tipo e concentração de surfactante utilizado na reação colorimétrica de SAs com p-DAC em amostras de leite bovino.

Nota: (a) Refletância média (n=3) obtida para diferentes tipos de surfactantes; (b) Refletância média (n=3) obtida em diferentes concentrações finais de SDS.

Entre os tensoativos catiônicos, aniônicos e zwitteriônico estudados, o SDS em meio ácido foi o que melhor favoreceu o equilíbrio iônico do meio reacional, promovendo maior pré-concentração do sal imino (Figura 11a). Os surfactantes podem promover mudanças que favorecem a sensibilidade analítica, elevando a detecção do sinal analítico do analito. A formação micelar no meio reacional pode influir na constante de equilíbrio, nas propriedades espectrais e na cinética das reações. Pode também inibir reações inesperadas e/ou estabilizar intermediários da reação (FERNANDES, 2011). As alterações das propriedades físico-químicas são oriundas de interações eletrostáticas e hidrofóbicas do tensoativo com íons e moléculas orgânicas. Tais interações podem acarretar ligações de ácido-base conjugadas com

as micelas por forças distintas, provocando em alterações na constante dielétrica, e consequentemente, modificando as constantes de equilíbrio de pares ácido-base, formação de complexos, extração e solubilidade (ESTEVE-ROMERO et al., 1995). Posteriormente, a concentração final de SDS foi avaliada na faixa de 0,8 a 24 mmol L⁻¹ (Figura 11b), apresentando melhor resposta analítica na concentração final de 16 mmol L⁻¹.

Em concentrações de surfactante acima de 16 mmol L⁻¹, a fase formada após a extração e centrifugação tornou-se turva. Acredita-se que esse fenômeno seja decorrente do aumento da solubilidade do SDS na amostra e da diminuição na solubilidade do solvente extrator que, interferiu na formação do sal imino, na absorvidade molar do composto formado, na recuperação das SAs e, consequentemente, diminuição do fator de enriquecimento (BEHBAHANI et al., 2013; SARAJI; BOROUJENI, 2014).

Um dos principais parâmetros a ser definido em um procedimento de extração, é o tipo de solvente extrator. Características como toxicidade, densidade, polaridade, afinidade com o analito e capacidade de extração são fatores primordiais a serem considerados na escolha do solvente (ZANG et al., 2009). Deste modo, para facilitar a análise *in situ*, os seguintes solventes de extração de baixa densidade foram avaliados: 1-butanol, 1-octanol, 1-decanol, 1-undecanol e 1-dodecanol (Figura 12). As condições experimentais empregadas foram: 2,00 mL de p-DAC (2,85 mmol L⁻¹), 500 µL de HNO₃ (0,60 mol L⁻¹), 500 µL de SDS (0,16 mol L⁻¹), 1,00 mL de leite enriquecido (500 µg L⁻¹) e 1,00 mL de solvente. Os parâmetros físicos utilizados foram: vórtex (5 min) e centrifugação (15 min a 4000 rpm).

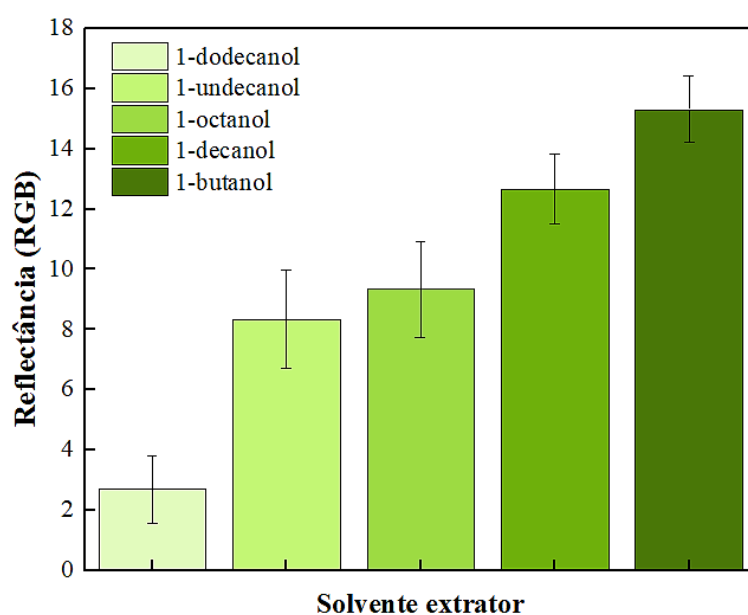


Figura 12. Efeito do tipo de solvente para extração em amostras de leite bovino. Nota: Refletância média (n=3) obtida para diferentes solventes extratores.

Os resultados demonstraram que, embora os solventes testados sejam menos densos que a água, com valores próximos ($0,80-0,90 \text{ g cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), diferem em grau de solubilidade de acordo com o tamanho da cadeia carbônica, pois quanto maior a molécula do solvente, mais apolar e insolúvel se torna em meio aquoso, o que dificulta a partição dos analitos (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013). Enquanto os outros solventes têm valores de solubilidade de aproximadamente $0,011-0,30 \text{ g cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, o 1-butanol tem solubilidade de 73 g L^{-3} , o que facilitou a dispersão na amostra pela extração seletiva da espécie desejada.

Para otimizar os parâmetros experimentais químicos e físicos, foram realizadas triagens e planejamentos fatoriais, a fim de obter as melhores condições experimentais que fornecessem as maiores respostas analíticas. Triagem foi feita para avaliar os modos de agitação por ultrassom, mesa orbital e vórtex nos tempos de 5 e 20 minutos, sob alta potência. Como resultado, a agitação em vórtex proporcionou melhor extração de SAs das amostras de leite, uma vez que esta agitação é mais vigorosa, promovendo a dispersão do solvente extrator e aumentando a superfície de contato entre as fases imiscíveis conferindo a partição dos analitos (DUARTE; DORES; VILLA, 2016; SU; JEN, 2010). Além disso, não houve diferenças significativas entre os tempos de 5 e 20 minutos. Portanto, com o objetivo de desenvolver um procedimento mais rápido, foi selecionado o modo de agitação em vórtex por 5 minutos para extração dos analitos de amostras de leite bovino.

Posteriormente, foram propostos dois delineamentos fatoriais 2^2 com três pontos centrais e axiais para otimizar: o volume de amostra e solvente, e tempo e velocidade de centrifugação. Os delineamentos apresentados incluíram 11 experimentos em cada planejamento, realizados em ordem aleatória para minimizar eventuais erros (Tabela 3).

Tabela 3. Delineamentos fatoriais propostos para otimização dos parâmetros experimentais.

Parâmetros	Variáveis	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Químicos	Amostra* (mL)	0,20	0,50	1,25	2,00	2,30
	Solvente (mL)	0,90	1,00	1,25	1,50	1,60
Físicos (centrífuga)	Tempo (min:seg)	5:00	08:38	17:30	26:22	30:00
	Velocidade (rpm)	3500	3863	4750	5636	6000

*Amostra enriquecida ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$).

Na Tabela 4 são apresentados os valores codificados, bem como as diferenças dos sinais analíticos e do branco referente à otimização dos parâmetros experimentais químicos.

Tabela 4. Planejamento $2^2 + PC +$ axial com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.

Ensaio	Reflectância (G)				
	Branco ou Amostra (mL)	1-butanol (mL)	Branco	Amostra	Diferença
1	0,5 (-)	1,0 (-)	125	137	12
2	2,0 (+)	1,0 (-)	0	0	0
3	0,5 (-)	1,5 (+)	107	109	2
4	2,0 (+)	1,5 (+)	123	136	13
5	1,25 (0)	1,25 (0)	126	140	14
6	1,25 (0)	1,25 (0)	128	148	20
7	1,25 (0)	1,25 (0)	126	143	17
8	0,2 (-1,41)	1,25 (0)	106	113	7
9	1,25 (0)	0,9 (-1,41)	0	0	0
10	2,3 (1,41)	1,25 (0)	0	0	0
11	1,25 (0)	1,6 (1,41)	123	127	4

Na Tabela 5 são apresentados os valores codificados, bem como as diferenças dos sinais analíticos e do branco referente à otimização dos parâmetros experimentais físicos.

Tabela 5. Planejamento $2^2 + PC +$ axial com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.

Ensaio	Reflectância (G)				
	Tempo de centrifugação (min:seg)	Velocidade de centrifugação (rpm)	Branco	Amostra	Diferença
1	08:38 (-)	3863 (-)	0	0	0
2	26:22 (+)	3863 (-)	119	151	32
3	08:38 (-)	5636 (+)	123	144	21
4	26:22 (+)	5636 (+)	127	137	10
5	17:30 (0)	4750 (0)	118	136	18
6	17:30 (0)	4750 (0)	125	135	10
7	17:30 (0)	4750 (0)	116	129	13
8	05:00 (-1,41)	4750 (0)	0	0	0
9	17:30 (0)	3500 (-1,41)	123	148	25
10	30:00 (1,41)	4750 (0)	122	150	28
11	17:30 (0)	6000 (1,41)	116	152	36

As condições químicas consideradas foram volume da amostra (x_1) (0,20-2,30 mL) e solvente (x_2) (0,90-1,60 mL); as condições físicas consideradas foram tempo (x_1) (5-30 minutos) e velocidade de centrifugação (x_2) (3500-6000 rpm). Em ambos os casos, foi

aplicado teste F para regressão e resíduo, e para avaliar a falta de ajuste e erro puro (Figura 13).

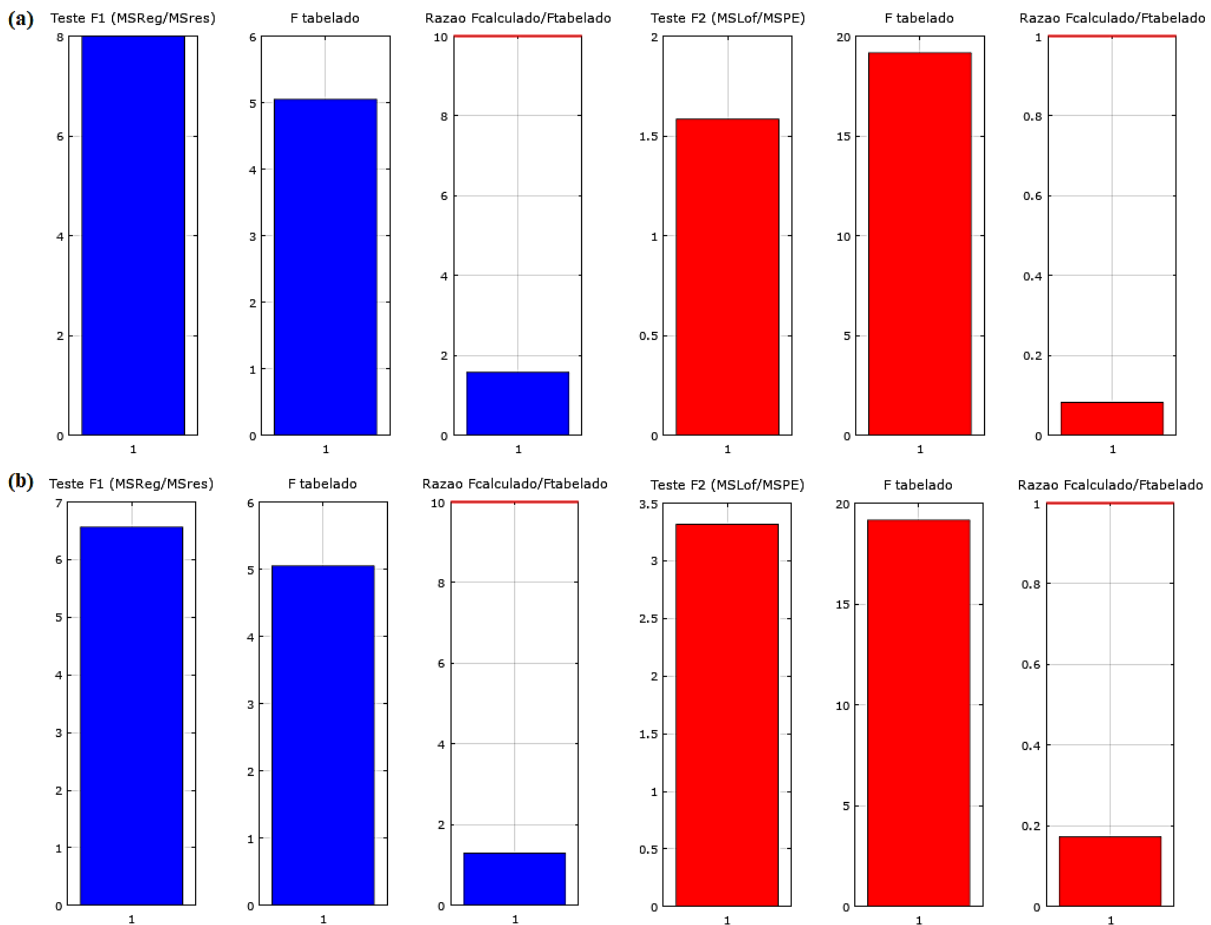


Figura 13. Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho). (a) parâmetro químicos e (b) parâmetros físicos.

A partir da Figura 13, foi observada que, embora a razão entre os valores de F calculados e tabulados permaneça menor que 10, a falta de ajuste foi menor que 1, demonstrando a adequação do modelo proposto.

Com base na análise de variância foi possível gerar os coeficientes de regressão (Figura 14).

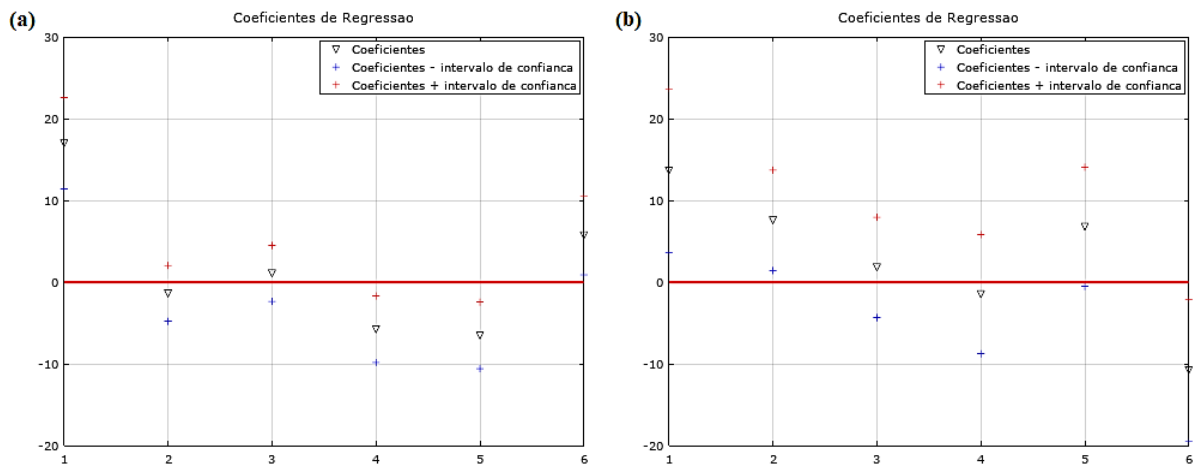


Figura 14. Coeficientes de regressão: (1) média; (2) variável 1; (3) variável 2; (4) interação 1²; (5) interação 2² e (6) interação 12. (a) parâmetro químico: (2) volume de amostra e (3) volume de 1-butanol; (b) parâmetro físico: (2) tempo de centrifugação e (3) velocidade de centrifugação.

Para as condições químicas, com exceção dos volumes de amostra e de 1-butanol, todos os demais coeficientes foram significativos: 16,99 (média), -5,75 (interação 1²), -6,5 (interação 2²) e 5,75 (interação 12). Para as condições físicas, com exceção da velocidade de centrifugação e interações 1² e 2², todos os demais coeficientes foram significativos: 13,67 (média), 7,58 (variável 1) e -10,75 (interação 12).

Os dados experimentais foram correlacionados, e relação empírica entre a resposta e as variáveis foi expressa pelos polinômios de segunda ordem de ajuste, em que o modelo de regressão quadrática para os dados obtidos pode ser expresso como (Equações 1 e 2):

$$\text{Resposta: } 16,99 - 5,75 x_1^2 - 6,50 x_2^2 + 5,75 x_1 x_2 \quad (1)$$

$$\text{Resposta: } 13,67 + 7,58 x_1 - 10,75 x_1 x_2 \quad (2)$$

Em que:

x_1 : volume da amostra

x_2 : volume de solvente

x_3 : tempo de centrifugação

x_4 : velocidade de centrifugação

Conforme demonstrado, os termos quadráticos têm a maior influência na eficiência de extração e isso é consistente com relatos na literatura (FERNÁNDEZ et al., 2013; KABIR;

LOCATELLI; ULUSOY, 2017; LEONG; FUH; HUANG, 2014; QUIGLEY; CUMMINS; CONNOLLY, 2016).

A partir dos resultados com os coeficientes mais significativos, foi possível obter gráficos de superfície de resposta e contorno para cada delineamento (Figura 15).

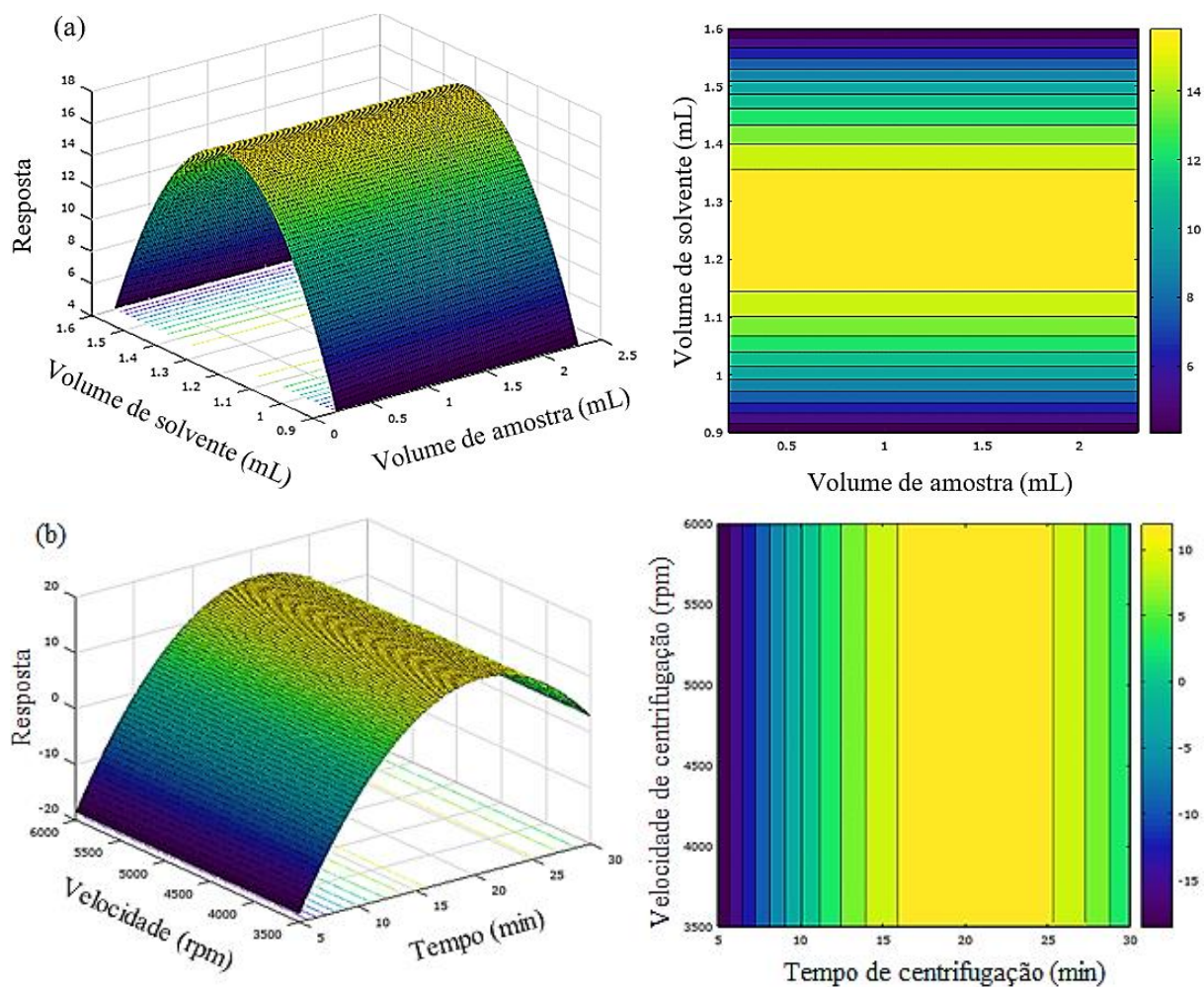


Figura 15. Gráficos de superfície de resposta e de contorno: parâmetros (a) químico e (b) físico.

Através da resolução das Equações 1 e 2, as condições experimentais otimizadas foram: 1,25 mL de amostra e 1-butanol (Figura 15a), agitação em vórtex por 5 minutos em alta velocidade e 17 min e 30 seg de centrifugação a 4750 rpm (Figura 15b).

Buscando melhorar a eficiência da extração e obter alto fator de enriquecimento, ensaios foram conduzidos visando reduzir ainda mais o volume de 1-butanol. Condições entre 0,50 e 1,25 mL foram avaliadas mantendo-se a concentração final otimizada dos reagentes (Figura 16). As condições experimentais empregadas foram: 500 μL de soro extraído previamente com 1,00 mL de TCA ($0,30 \text{ mol L}^{-1}$). Os parâmetros físicos empregados foram: vórtex (5 min) e centrifugação (17 min e 30 seg a 4750 rpm).

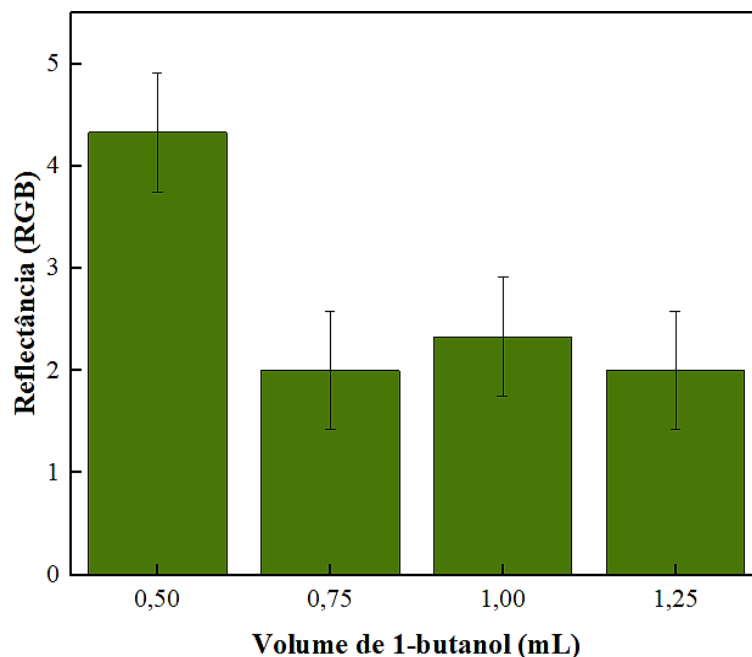


Figura 16. Efeito do volume de 1-butanol para extração em amostras de leite bovino.
Nota: Refletância média (n=3) obtida em diferentes volumes de 1-butanol.

Não houve diferença significativa nas medidas para volumes acima de 0,75 mL de 1-butanol, e o maior sinal foi obtido com 0,50 mL que foi selecionado para estudos subsequentes. Dado o pequeno volume de solvente, foi fixado o zoom de 1,5 vezes no smartphone, para que fosse possível a medida digital.

O efeito de espécies potencialmente interferentes (Ca^{2+} , Fe(III) , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+}) na determinação das SAs totais pelo método DLLME foi individualmente avaliado. Foram utilizadas soluções de SAs $250 \mu\text{g L}^{-1}$ em leite, contendo $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie. Ensaio de adição e recuperação foram conduzidos e os resultados foram comparados àqueles obtidos na ausência das espécies (Tabela 6).

Tabela 6. Ensaio de adição e recuperação para análise de espécies potencialmente interferentes.

Espécies*	Sinal (RGB)		Recuperação (%)
	SAs	SAs + espécie concomitante	
Ca^{2+}	$1,7 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6$	$80,2 \pm 0,3$
Mg^{2+}	$1,7 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,6$	$100,0 \pm 0,3$
Na^+	$1,7 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,6$	$100,0 \pm 0,3$
Fe(III)	$1,3 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6$	$100,0 \pm 0,4$
Mn^{2+}	$1,3 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6$	$100,0 \pm 0,4$
K^+	$2,3 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,6$	$100,0 \pm 0,2$
Zn^{2+}	$2,3 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,6$	$114,3 \pm 0,2$

*Amostras enriquecidas com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de SAs e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie.

Os resultados dos ensaios apresentaram recuperações entre 80 e 114%, podendo-se concluir que tais espécies, mesmo em concentrações significativamente elevadas, não causaram interferência no procedimento proposto (variação do sinal <5%), o que demonstra a seletividade do método.

Curvas de calibração na faixa entre 50 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ SAs totais foram obtidas para extração com 0,50 e 1,25 mL de 1-butanol (Figura 17). As condições experimentais empregadas para 0,50 mL foram: 2,25 mL de p-DAC 1,902 mmol L^{-1} em HNO_3 (0,10 mol L^{-1}); 500 μL de SDS (0,12 mol L^{-1}). Para 1,25 mL, as condições experimentais empregadas foram: 2,25 mL de p-DAC 2,28 mmol L^{-1} em HNO_3 (0,12 mol L^{-1}); 500 μL de SDS (0,144 mol L^{-1}). Em ambos os casos, foram empregados os parâmetros físicos otimizados: vórtex (5 min) e centrifugação (17 min e 30 seg a 4750 rpm).

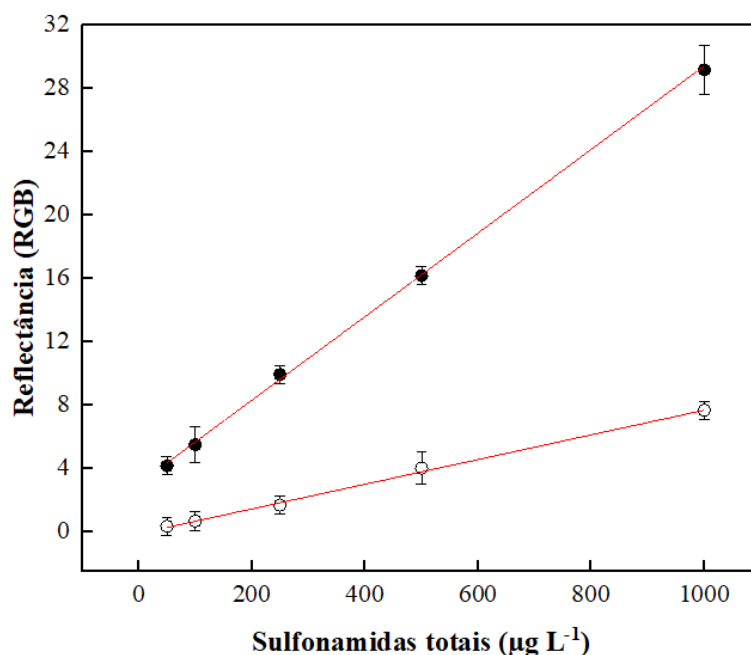


Figura 17. Curvas de calibração para extração de SAs de amostras de leite com 0,50 (●) e 1,25 mL (○) de 1-butanol.

A melhor resposta linear foi observada para extração com 0,50 mL de solvente [Sinal analítico = $3,02 + 0,03 C$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($R^2 = 0,999$)], onde a sensibilidade foi três vezes superior à extração com 1,25 mL [Sinal analítico = $-0,13 + 0,01 C$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ($R^2 = 0,998$)], com coeficiente de variação ($n=11$; 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ SAs totais) estimado em 0,49%.

O limite de detecção (LD) foi estimado diminuindo a concentração de SAs até que o sinal analítico fosse diferente do branco analítico. O procedimento foi realizado em triplicata

entre a faixa de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ SAs totais, e o LD foi estimado em 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ SAs totais, resultado 5 vezes inferior ao LMR permitido pela legislação (100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Para 500 μL de amostra, foram consumidos 49 mg de TCA, 0,75 mg de p-DAC, 17 mg de SDS, e 500 μL de 1-butanol, o que resultou na geração de apenas 3,75 mL de resíduos por amostra, atendendo os preceitos da Química Analítica Verde (ANASTAS; WARNER, 1998).

Como alternativa aos métodos analíticos convencionais (como as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas), o uso de smartphone para mensurar os sinais analíticos através da captura de imagens digitais é estratégia econômica e atraente no desenvolvimento de metodologia prática, rápida, limpa, acessível, reproduzível, sensível e eficaz para a determinação de SAs totais em amostras de leite e carne a partir de baixa quantidade de solvente e reagente (FAN et al., 2021; KWON; PARK, 2017; LIMA; NASCIMENTO; ROCHA, 2017; RATENI; DARIO; CAVALLO, 2017).

A comparação entre as medidas obtidas por imagem digital com aquelas realizadas em espectrofotômetro foi realizada. Em tubo de ensaio foram adicionados 1,25 mL de solução-padrão, 2,25 mL p-DAC (2,66 mmol L^{-1}) em HNO_3 (0,14 mol L^{-1}), 500 μL de SDS (0,168 mol L^{-1}) e 1,25 mL de 1-butanol para extração e obtenção das curvas de calibração na faixa entre 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ SAs totais. As amostras foram agitadas em vórtex (5 minutos em alta potência) e centrifugadas (17 min e 30 seg a 4750 rpm) e posteriormente submetidas às medidas digitais.

Devido à possibilidade de se realizar a leitura *in situ*, primeiramente as medidas por imagem digital foram realizadas através do canal G do sistema RGB utilizando o Color Grab® (Loo-matix®, version 3.6.1, 2017). Em seguida, com o auxílio de microseringa de 1,0 mL, a fase sobrenadante de cada ensaio foi transferida para cubeta de volume reduzido com 1,0 cm de caminho óptico. As medidas espectrofotométricas foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção do sal imino (560 nm), conforme descrito na literatura (FERNANDES et al., 2015). Os dados mensurados pelo smartphone (reflectância) e pelo espectrofotômetro (absorbância) foram plotados (Figura 18).

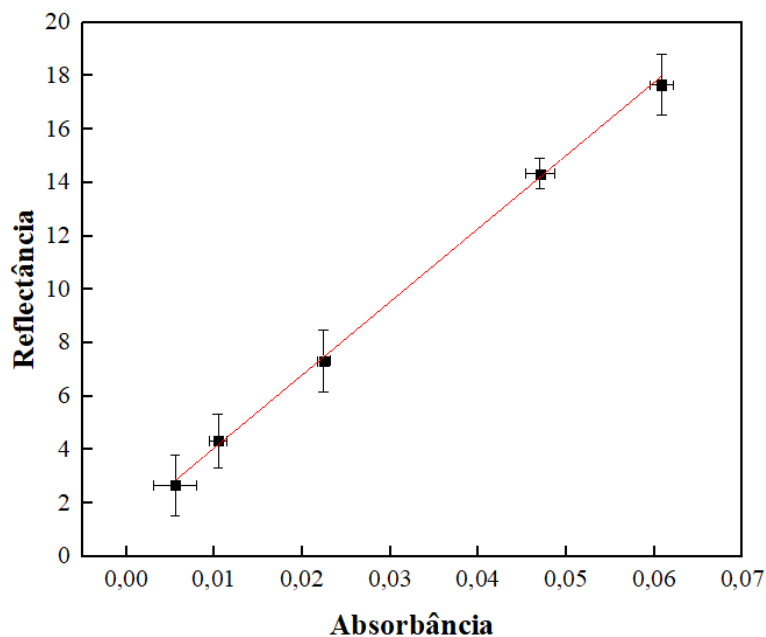


Figura 18. Comparação entre os sinais analíticos obtidos por imagens digitais e espectrofotometria.

Através da interpretação gráfica, foi possível comparar as técnicas empregadas e verificar a linearidade descrita pela equação da reta: $\text{Reflectância} = 1,33 + 273,98 \text{ Absorbância}$ ($R^2 = 0,998$). Embora as medidas por imagens digitais sejam menos sensíveis que as medidas espectrofotométricas, o uso do smartphone no procedimento proposto permitiu o alcance de limite de detecção cinco vezes abaixo do LMR estabelecido pela legislação ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). Pôde-se concluir que a determinação dos analitos por medidas de imagens digitais é aplicável, podendo ser usado em medidas analíticas como alternativa economicamente viável frente à espectrofotometria.

Amostras de leite bovino foram analisadas através do método de adição e recuperação. O método proposto foi executado em triplicata para determinar as SAs totais, após as amostras serem enriquecidas com 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 7). As condições experimentais empregadas foram: 0,50 mL soro previamente extraído com 1,00 mL de TCA ($0,30 \text{ mol L}^{-1}$), 2,25 mL p-DAC ($2,28 \text{ mmol L}^{-1}$) em HNO_3 ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$), 0,50 mL SDS ($0,144 \text{ mol L}^{-1}$) e 1,25 mL de 1-butanol. Os parâmetros físicos empregados foram: vórtex (5 min) e centrifugação (17 min e 30 seg a 4750 rpm).

Tabela 7. Ensaio de adição e recuperação (n=3) para determinação de sulfonamidas totais em amostras de leite bovino.

Amostras de leite	Sulfonamidas totais ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)
A ^a	50,0	50,0	100,0 \pm 1,5	500,0	437,5	87,5 \pm 1,5
B ^a	50,0	49,5	99,0 \pm 0,6	500,0	499,5	99,9 \pm 0,6
C ^a	50,0	50,0	100,0 \pm 0,6	500,0	500,0	100,0 \pm 0,6
D ^b	50,0	50,0	100,0 \pm 0,6	500,0	450,1	90,0 \pm 0,6

^a amostras de leite integral; ^b amostras de leite desnatado.

Os resultados obtidos apresentaram valores de recuperações entre 87 e 100,0%, indicando a ausência de efeitos de matriz, e demonstrando a precisão do procedimento proposto.

O procedimento proposto foi comparado com o procedimento de referência de determinação de SAs por HPLC. Seis tipos de leite (desnatado, semidesnatado, sem lactose, integral, pasteurizado e em pó) enriquecidos a 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram avaliados (Tabela 8). A limpeza das amostras e soluções padrão (curva analítica) foi realizada conforme apresentado no item 4.6.1 e 4.6.4.

Tabela 8. Determinação de sulfonamidas em amostras de leite enriquecido com 100 ou 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ pelo procedimento proposto e de referência.

Amostras	Sulfonamidas ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Procedimento proposto	Procedimento de referência*
1	84,3 \pm 0,5	81,6 \pm 5,6
2	75,9 \pm 0,5	89,2 \pm 3,4
3	101,0 \pm 0,6	100,9 \pm 2,1
4	184,8 \pm 1,1	172,3 \pm 6,5
5	176,4 \pm 1,1	171,9 \pm 7,1
6	205,7 \pm 1,2	217,7 \pm 6,6

*Guo et al. (2012). Erros correspondem ao desvio padrão (n=3).

Os resultados foram concordantes com o procedimento de referência baseado em HPLC-UV (GUO et al., 2012) a um nível de confiança de 95%, demonstrando a aplicabilidade do procedimento desenvolvido.

Em comparação com outros métodos baseados na DLLME para análise de SAs totais em leite (Tabela 9), as características analíticas obtidas com o procedimento proposto foram

satisfatórias, atingindo valores de recuperação dentro da faixa esperada (80–20%). O limite de detecção ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) foi abaixo do LMR ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) de SAs totais em alimentos de origem animal, estabelecido pelos órgãos reguladores.

Outras metodologias que empregam HPLC, apresentam características analíticas adequadas para quantificação de SAs, como amplas faixas lineares ($2 - 500 \mu\text{g L}^{-1}$ SAs) e baixos LD ($< 0,5$). No entanto, apresentam desvantagens no preparo de amostra. A metodologia QuEChERS emprega várias etapas tais como extração com solvente e separação em salting-out. A limpeza com PSA foi a parte mais trabalhosa do procedimento, o que implica no aumento da possibilidade de erros analíticos entre as análises. O mesmo ocorreu com a utilização de procedimentos envolvendo líquidos iônicos, que, além das diversas etapas envolvidas no preparo de amostras, requerem etapa de diluição com acetonitrila para análise por HPLC (GAO et al., 2012).

A principal vantagem do procedimento proposto foi a possibilidade de explorar as medidas de imagens digitais para determinação de SAs totais em amostras de leite bovino com ferramentas e equipamentos acessíveis e de baixo custo, como o smartphone. Além disso, o método estudado apresentou alta frequência analítica, dado o pouco tempo necessário para a realização das análises (aproximadamente 37 minutos) em comparação àqueles dispostos na literatura (ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014; GAO et al., 2012; XU et al., 2011; YAO; DU, 2020).

No presente estudo, foram consumidos por determinação, baixos volumes de reagentes ($2,25 \text{ mL}$ de p-DAC $1,902 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio HNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mL}$ de SDS $0,12 \text{ mol L}^{-1}$) e de solvente orgânico ecologicamente correto ($0,5 \text{ mL}$ de 1-butanol), gerando $3,75 \text{ mL}$ de resíduo de baixa toxicidade. Com o método proposto, o consumo de solvente foi reduzido em aproximadamente 35% em comparação com método QuEChERS típico com detecção de HPLC-FL e foi 6 vezes menor que o procedimento DLLME com derivatização por fluorescamina (ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014). O procedimento demonstrou ser alternativa viável na determinação de SAs totais em amostras de leite bovino, constituindo metodologia prática, rápida, limpa, acessível, reprodutível, sensível e eficaz a partir de diminuta quantidade de reagentes e de solvente de baixa toxicidade. Este trabalho foi publicado na revista *Microchemical Journal* (v. 170, p. 106657, nov. 2021: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106657>).

Tabela 9. Características analíticas de métodos de microextração para determinação de sulfonamidas em amostras de leite bovino.

Amostra	Extração	Reagentes para limpeza de amostra	Solvente extrator	Reagente analítico	Método de determinação	Tempo de preparo de amostra (min)	Tempo de determinação (min)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Leite	MIL-DLLME	TCA/ Hidróxido de amônio	MIL e barra magnética de NdFeB	Solução aquosa de KPF_6 ($0,1 \text{ g mL}^{-1}$)	HPLC-UV	6	20	3 – 500	0,53 – 0,89	(YAO; DU, 2020)
Leite	DLLME	TCA	Clorofórmio (1,0 mL) / ACN (1,9 mL)	Fluorescamina	RP-HPLC-FL	>10	145	2 – 250	0,60 – 1,21	(ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014)
Leite	QuEChERS	MgSO_4 / NaCl / citrato de sódio / $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Na}_4\text{O}_{17}$ / C_{18} / PSA		Ácido acético (5%) em ACN / Fluorescamina / tris-(hidroximetil)-aminometano	RP-HPLC-FL	>22	145	4 – 250	1,15 – 2,73	(ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2014)
Fórmula infantil	UA-IL-DLLME	Orthophosphoric acid / NH_4PF_6 / $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$ (70 μL) / $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{BF}_4]$ (100 μL)		ACN / ácido fórmico (0,1%)	RP-HPLC-PDA	40	30	12 – 556	2,94 – 16,7	(GAO et al., 2012)
Leite	IL-MA-DLLME	TCA / Acetato de sódio	$[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$ (100 μL) / NaCl / metanol (0,75 mL)	ACN / Fluorescamina	HPLC-FL	22	150	0,1 – 5,0	0,018 – 0,031	(XU et al., 2011)
Leite	DLLME	TCA	1-butanol (0,5 mL)	p-DAC	Medidas de imagens digitais	37	<2	50 – 1000	20,0	Este trabalho

ACN: acetonitrila; DLLME: Microextração Líquido-Líquido Dispersivo; HPLC-FL: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência; IL-MA-DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por micro-ondas à base de líquido iônico; MIL-DLLME: microextração líquido-líquido dispersivo líquido iônico magnético; p-DAC: 4-dimetilaminocinamaldeído; PSA: amina primária e secundária; QuEChERS: Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto, Seguro; RP-HPLC-FL: cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detector de fluorescência; RP-HPLC-PDA: cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção por arranjo de fotodiodos; TCA: ácido tricloroacético; UA-IL/IL-DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva à base de líquido iônico assistida por ultrassom.

5.2. Microextração sólido-líquido dispersiva de sulfonamidas totais em carne bovina

5.2.1. Otimização dos parâmetros físico-químicos

Uma vez que a extração de SAs totais de amostras de carne bovina foi baseada na metodologia desenvolvida para extração em leite, os ensaios realizados em carne também empregaram o mesmo tipo de ácido (HNO_3) e surfactante (SDS). Contudo, foi feito apenas o ajuste de volume e concentração de ambos os reagentes.

Os ensaios foram conduzidos na ausência de carne para avaliar a sensibilidade do método frente aos solventes acetonitrila, etanol e metanol. Deste modo, os experimentos foram realizados mantendo fixo o volume da solução-padrão de SAs ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$), variando os volumes de solução-reagente B e de solventes de modo que ao final de cada ensaio remanescesse $100 \mu\text{L}$ (Tabela 10 e Figura 19). Condições experimentais: Para cada teste foi utilizada uma solução-reagente de diferentes concentrações, mantendo-se a concentração final igual nos $100 \mu\text{L}$ finais. Os parâmetros físicos empregados foram: agitação orbital (20 min a 200 rpm) e centrifugação (20 min a 6000 rpm).

Tabela 10. Otimização do tipo de solvente para extração em amostras de carne bovina.

Ensaio	A	B	C	D	E	F
Solução-padrão* (μL)	30					
Solventes** (μL)	60	50	40	30	20	10
Solução-reagente B*** (μL)	10	20	30	40	50	60

*Solução-padrão de SAs ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$); **Acetonitrila, etanol ou metanol; ***para cada ensaio foi usado uma solução-reagente de concentração inicial diferente, para manter a concentração final igual em todos os experimentos.

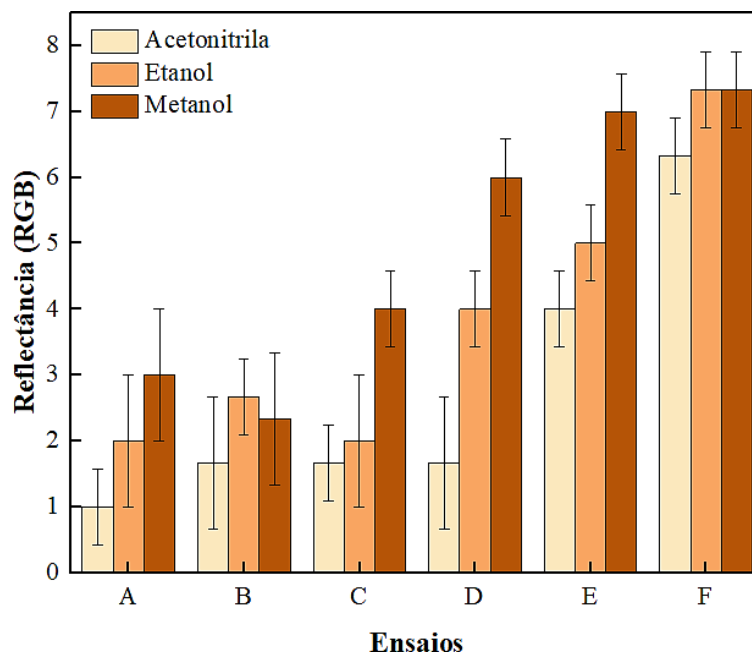


Figura 19. Efeito do tipo de solvente na reação colorimétrica de SAs com p-DAC em amostras de carne bovina.

Embora o metanol tenha apresentado melhor resposta analítica frente à acetonitrila e etanol em todos os ensaios (Figura 19), verificou-se que os solventes testados influenciaram na absorvidade molar do composto formado (sal imino), uma vez que foi notada a alteração e diminuição da intensidade da cor, influenciando na sensibilidade do método e, conseqüentemente, na medida do sinal analítico.

Posteriormente, foi avaliada a extração em carne utilizando o etanol, metanol e 1-butanol como solvente extrator, conforme procedimento experimental descrito no item 4.6.3. Os resultados foram comparados com o mesmo ensaio na ausência de carne, e a melhor condição de extração foi observada para os testes em que foram utilizados 300 μL de 1-butanol e 60 μL de solução-reagente B, com recuperação de $91,7 \pm 0,2\%$ ($n = 3$).

Após terem sido observados resultados promissores quanto ao uso do 1-butanol para a extração dos analitos, buscou-se avaliar em que volume de 1-butanol a extração das SAs provenientes da carne resultaria em sinal analítico mais significativo. Para isto, cinco ensaios foram realizados partindo de 300 mg de carne moída enriquecida ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$). A faixa de volume de solvente estudada variou de 150 a 300 μL (Tabela 11). Os microtubos foram agitados (mesa orbital, 20 min a 200 rpm) e centrifugados em mini centrífuga de velocidade fixa (20 min a 6000 rpm). Na sequência, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo contendo 60 μL da solução-reagente B para promover a reação de formação

do sal imino. Os microtubos foram homogeneizados manualmente e centrifugados para a separação da fase rica contendo o analito, que foi mensurada digitalmente.

Tabela 11. Otimização do volume de 1-butanol para extração em amostras de carne bovina.

Ensaio	A	B	C	D	E
Carne* (mg)	300				
1-butanol (μL)	150	200	250	275	300
Recuperação (%)	119,4 \pm 2,9	111,1 \pm 2,4	61,1 \pm 1,2	100,0 \pm 0,6	77,8 \pm 0,6

*Amostras enriquecidas com 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SAs totais.

Os resultados obtidos nos ensaios A e B (Tabela 11) foram descartados, pois a fase sobrenadante disponível para ser pipetada e transferida para o microtubo contendo 60 μL de solução-reagente B foi insuficiente (inferior a 100 μL), conferindo erros analíticos consideráveis. Sendo assim, o volume de 275 μL (ensaio D) foi o que apresentou melhor condição para extração dos analitos, atingindo 100,0 \pm 0,6% de recuperação.

Buscando obter as melhores condições experimentais que fornecessem maiores respostas analíticas, a quantidade de amostra de carne necessária às determinações, também foi estudada. Para isto, ensaios foram feitos com 300 e 750 mg, empregando os volumes de 250 e 275 μL de 1-butanol (Tabela 12). Para confirmação do resultado, o ensaio III neste experimento, foi o mesmo realizado anteriormente (ensaio C da Tabela 11).

Tabela 12. Otimização da massa de amostra para extração em carne bovina.

Ensaio	I	II	III
Amostra (mg)	750 ^a	750 ^a	300 ^b
1-butanol (μL)	275	250	250
Recuperação (%)	94,4 \pm 0,4	113,3 \pm 0,8	72,2 \pm 0,2

^a Amostras enriquecidas (1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de SAs totais). ^b Amostras enriquecidas (1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de SAs totais).

Os resultados obtidos (Tabela 12) foram comparados entre si e com aqueles dispostos na Tabela 11. Foi possível observar que a quantidade elevada de carne para menor volume de solvente (ensaio II) dificulta a extração, pois mesmo após a centrifugação, não sobrou solvente suficiente para ser transferido para outro microtubo para a reação colorimétrica. Embora os ensaios III (Tabela 12) e C (Tabela 11) tenham apresentado resultados satisfatórios, o ensaio I foi selecionado, pois apresentou melhor recuperação na análise, com 94,4 \pm 0,4%.

Para obter as melhores condições experimentais, triagens e planejamentos fatoriais foram realizados a fim de otimizar os parâmetros experimentais físicos, como: tipo e tempo de agitação e tempo de centrifugação.

Foi realizada a triagem (planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais e axiais) para avaliar a eficiência de extração com agitação por vórtex, mesa orbital e ultrassom, nos tempos de 5, 20 e 35 minutos, sob alta potência (Tabela 13). Os ensaios foram conduzidos com 750 mg de amostra enriquecida ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$), 275 μL de 1-butanol e 60 μL de solução-reagente B (n=1).

Tabela 13. Delineamento fatorial proposto para otimização do tipo e tempo de agitação e tempo de centrifugação.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Tipo de agitação	Vórtex	Mesa orbital	Ultrassom
Tempo de agitação (min)	5	20	35
Tempo de centrifugação (min)	5	20	35

Na Tabela 14, são apresentados os valores codificados, bem como as diferenças dos sinais analíticos e do branco, e as porcentagens de recuperação estimadas para SAs totais.

Tabela 14. Planejamento $2^3 + \text{PC} + \text{axial}$ com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.

Ensaio	Tipo de agitação	Tempo de agitação (min)	Tempo de centrifugação (min)	Reflectância (G)			
				Branco	Padrão	Diferença	Recuperação (%)
1	ultrassom (+)	35 (+)	35 (+)	0	0	0	0
2	ultrassom (+)	35 (+)	5 (-)	0	0	0	0
3	ultrassom (+)	5 (-)	35 (+)	0	0	0	0
4	ultrassom (+)	5 (-)	5 (-)	0	0	0	0
5	vórtex (-)	35 (+)	35 (+)	80	82	2,0	66,7
6	vórtex (-)	35 (+)	5 (-)	81	84	3,0	100,0
7	vórtex (-)	5 (-)	35 (+)	80	81	1,0	27,3
8	vórtex (-)	5 (-)	5 (-)	0	0	0	0
9	mesa (0)	20 (0)	20 (0)	77	79	2,0	66,7
10	mesa (0)	20 (0)	20 (0)	81	83	2,0	66,7
11	mesa (0)	20 (0)	20 (0)	78	80	2,0	66,7

Como resultado, o uso do ultrassom foi ineficaz para promover a partição dos analitos da matriz em todos os tempos. Visando procedimento mais rápido e prático, além da exclusão do tipo de agitação via ultrassom, o tempo de 35 minutos também foi rejeitado. Assim, novo planejamento fatorial (2^3) foi proposto, variando em dois níveis as variáveis tipo e tempo de agitação e tempo de centrifugação nos tempos de 5 e 20 minutos (Tabela 15).

Tabela 15. Delineamento fatorial proposto para otimização do tipo e tempo de agitação e centrifugação.

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Tipo de agitação	Mesa orbital	Vôrtex
Tempo de agitação (min)	5	20
Tempo de centrifugação (min)	5	20

Os valores codificados e reais são apresentados na Tabela 16, bem como as diferenças dos sinais analíticos e do branco, e as porcentagens de recuperação estimadas para SAs totais.

Tabela 16. Planejamento 2^3 com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.

Ensaio	Tipo de agitação	Tempo de agitação (min)	Tempo de centrifugação (min)	Reflectância (G)			
				Branco	Padrão	Diferença	Recuperação (%)
1	vôrtex (+)	20 (+)	20 (+)	80	82	2,0	50,0
2	vôrtex (+)	20 (+)	5 (-)	75	76	1,0	25,0
3	vôrtex (+)	5 (-)	20 (+)	75	78	3,0	75,0
4	vôrtex (+)	5 (-)	5 (-)	76	79	3,0	75,0
5	mesa (-)	20 (+)	20 (+)	80	84	4,0	100,0
6	mesa (-)	20 (+)	5 (-)	80	78	0	0
7	mesa (-)	5 (-)	20 (+)	76	80	4,0	100,0
8	mesa (-)	5 (-)	5 (-)	76	78	2,0	50,0

Para interpretação dos resultados, foi construído o gráfico de porcentagem de efeitos (Figura 20), que mostra as respostas obtidas a partir das interações entre as variáveis tipo de agitação (1), tempo de agitação (2) e tempo de centrifugação (3).

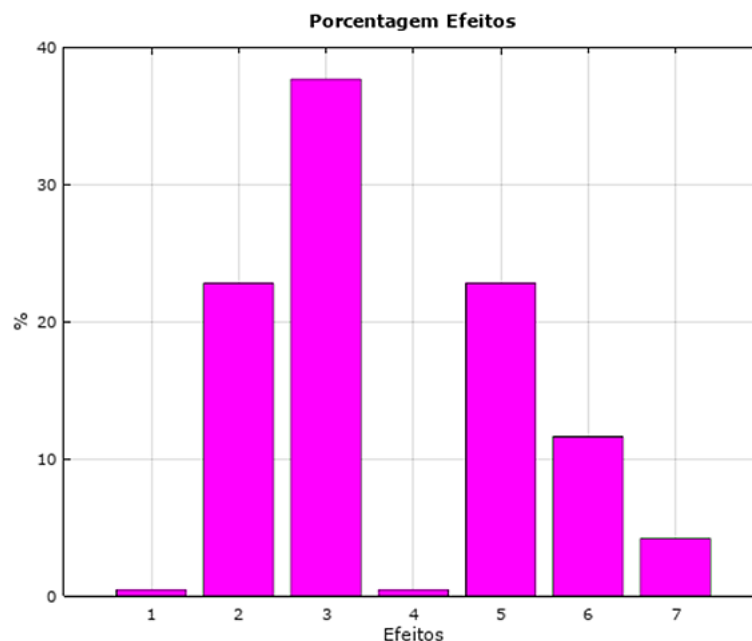


Figura 20. Porcentagem dos efeitos em relação às variáveis e interações, (1) tipo de agitação; (2) tempo de agitação; (3) tempo de centrifugação; (4) interação 12; (5) interação 13; (6) interação 23 e (7) interação 123.

As interações mais significativas observadas (Figura 20) entre as variáveis foram: tempo de agitação (efeito 2; 22,79%), tempo de centrifugação (efeito 3; 37,67%) e interação entre tipo de agitação e tempo de centrifugação (efeito 5; 22,79%).

A agitação em mesa orbital se mostrou mais eficaz na extração dos analitos da matriz, alcançando 100% de recuperação ($n=1$). Em contrapartida, acredita-se que, embora a agitação em vórtex tenha facilitado a mistura do solvente na amostra, houve dificuldade na separação de fases após a centrifugação. Observou-se que, após os primeiros 5 minutos de agitação vigorosa em vórtex, a carne apresentou aparência pastosa, restando pouco solvente a ser transferido. Portanto, a agitação em mesa orbital foi selecionada para dar continuidade nos ensaios subsequentes.

Após ter sido definido o tipo de agitação, foi proposto o planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais e axiais para avaliar o tempo de agitação (x_1) e tempo de centrifugação (x_2), ambos entre 2 e 24 minutos. O delineamento apresentado incluiu 11 experimentos, que foram realizados em ordem aleatória para minimizar eventuais erros sistemáticos (Tabela 17).

Tabela 17. Delineamento fatorial proposto para otimização do tempo de agitação em mesa orbital e tempo de centrifugação.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Tempo de agitação em mesa orbital (min)	2	5	13	21	24
Tempo de centrifugação (min)	2	5	13	21	24

Na Tabela 18 são apresentados os valores codificados, bem como as diferenças dos sinais analíticos e do branco referente à otimização dos parâmetros experimentais.

Tabela 18. Planejamento $2^2 + PC +$ axial com valores codificados e diferenças dos sinais analíticos.

Ensaio	Tempo de agitação (min)	Tempo de centrifugação (min)	Reflectância (G)			Recuperação (%)
			Branco	Amostra	Diferença	
1	5 (-)	5 (-)	77	78	1,0	25,0
2	21 (+)	5 (-)	75	78	3,0	75,0
3	5 (-)	21 (+)	74	76	2,0	50,0
4	21 (+)	21 (+)	78	80	2,0	50,0
5	13 (0)	13 (0)	75	78	3,0	75,0
6	13 (0)	13 (0)	74	77	3,0	75,0
7	13 (0)	13 (0)	75	78	3,0	75,0
8	2 (-1,41)	13 (0)	74	77	3,0	75,0
9	13 (0)	2 (-1,41)	76	77	1,0	25,0
10	24 (1,41)	13 (0)	74	77	3,0	75,0
11	13 (0)	24 (1,41)	75	78	3,0	75,0

Foi aplicado teste F para regressão e resíduo, e para avaliar a falta de ajuste e erro puro (Figura 21).

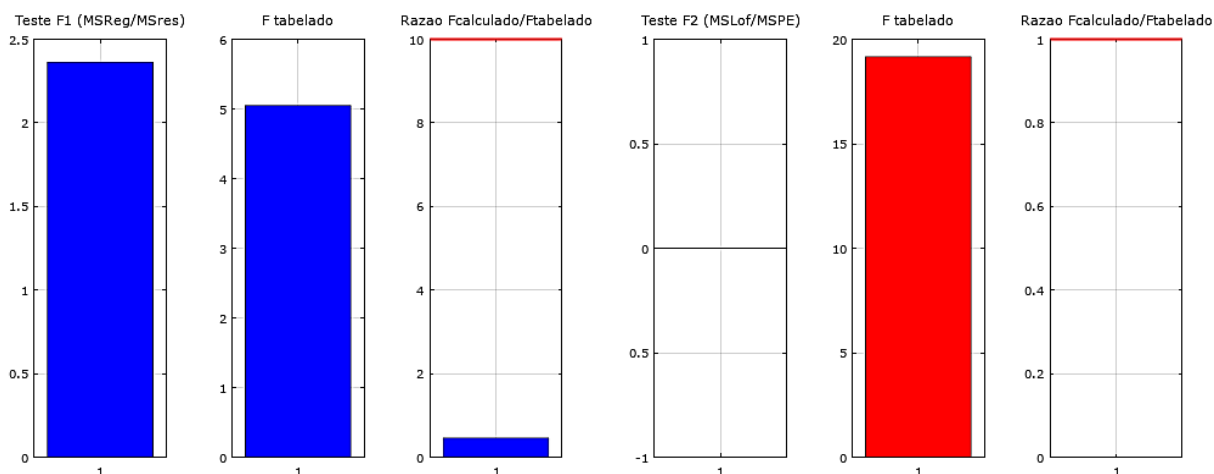


Figura 21. Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).

A partir da Figura 21 foi observada que, embora a razão entre os valores de F calculados e tabulados permaneceu menor que 10, a falta de ajuste foi menor que 1, demonstrando que o modelo proposto foi adequado.

Com base na análise de variância foi possível gerar os coeficientes de regressão (Figura 22).



Figura 22. Coeficientes de regressão: (1) média; (2) variável 1; (3) variável 2; (4) interação 1²; (5) interação 2² e (6) interação 12.

Com exceção dos coeficientes média e interação 2², todos os demais não foram significativos. Os coeficientes significativos foram: 75,00 (média) e -15,63 (interação 2²).

Os dados experimentais foram correlacionados, e a relação empírica entre a resposta e as variáveis estudadas foi expressa pelos polinômios de segunda ordem de ajuste, em que o modelo de regressão quadrática para os dados obtidos pode ser expresso como (Equação 3):

$$\text{Resposta: } 75,00 - 15,63 x_2^2 \quad (3)$$

Em que:

x_2 : tempo de centrifugação

Conforme demonstrado, os termos quadráticos conferem maior influência na eficiência de extração (FERNÁNDEZ et al., 2013; KABIR; LOCATELLI; ULUSOY, 2017; LEONG; FUH; HUANG, 2014; QUIGLEY; CUMMINS; CONNOLLY, 2016).

A partir das condições de reação pré-estabelecidas (750 mg de amostra enriquecida ($1500 \mu\text{g kg}^{-1}$), 275 μL de 1-butanol e 60 μL de solução-reagente B), e dos resultados com os coeficientes mais significativos, foi possível obter o gráfico superfície de resposta e de contorno para o delineamento fatorial proposto (Figura 23).

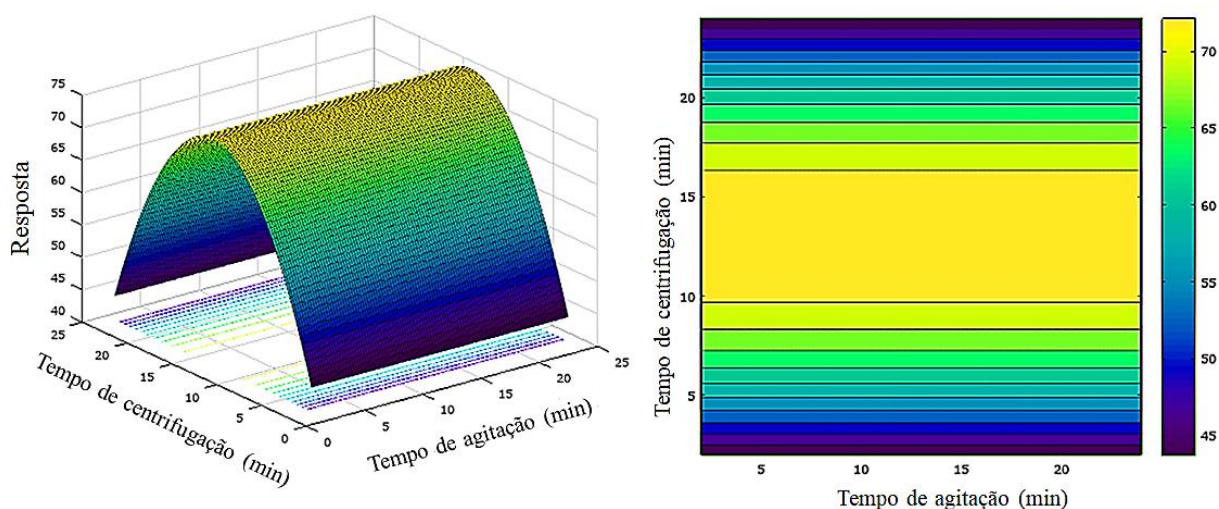


Figura 23. Gráficos de superfície de resposta e de contorno para os parâmetros físicos.

A partir da resolução da Equação 3, as condições experimentais ótimas para extração e pré-concentração das SAs de amostras de carne bovina foram: 13 minutos de agitação em mesa orbital (200 rpm) e 13 minutos de centrifugação em mini centrífuga de velocidade fixa (6000 rpm). Para validação, o ponto central foi reproduzido novamente ($n=3$), atingindo $84,6 \pm 0,1\%$ de recuperação.

As características analíticas do procedimento proposto foram estimadas com as condições otimizadas e a curva de calibração na faixa entre 33 e $233 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi obtida para extração a partir de 750 mg de carne enriquecida e 275 μL de 1-butanol (Figura 24).

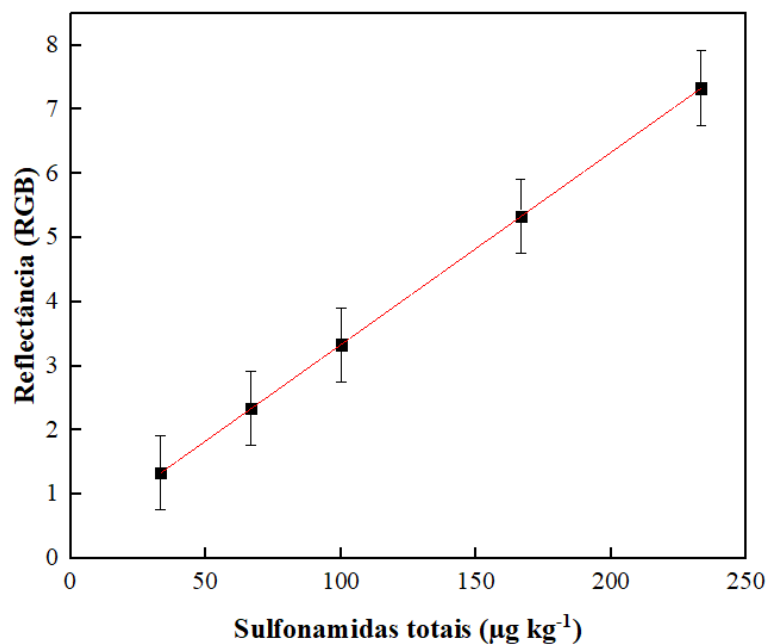


Figura 24. Curva de calibração para extração de SAs de amostras de carne bovina com 275 μL de 1-butanol ($n=3$).

Foi observada resposta linear entre 33 e 233 $\mu\text{g kg}^{-1}$, expressa pela equação: Sinal analítico = $0,33 + 0,03 C$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ($R^2 = 0,999$), com coeficiente de variação ($n = 11$; 67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de SAs totais) estimado em 0,63%. O LD foi estimado diminuindo a concentração de SAs até que o sinal analítico fosse diferente do branco analítico. O LD foi estimado em 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SAs totais, resultado 10 vezes inferior ao LMR permitido pela legislação (100 $\mu\text{g L}^{-1}$), demonstrando boa sensibilidade pelo método proposto.

Para 750 mg de amostra, foram consumidos 0,11 mg de p-DAC, 2,58 mg de SDS e 275 μL de 1-butanol, o que resultou na geração de apenas 335 μL de resíduo por amostra, atendendo os preceitos da Química Analítica Verde (ANASTAS; WARNER, 1998).

Sete amostras de carne bovina foram analisadas através do método de adição e recuperação. O método proposto foi executado em triplicata para determinar as SAs totais após as amostras serem enriquecidas com 66,7 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os resultados estão apresentados na Tabela 19. As condições experimentais empregadas foram: 750 mg de carne (1000 ou 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SAs totais), 275 μL 1-butanol e 60 μL solução-reagente B. Os parâmetros físicos empregados foram: mesa agitadora orbital (13 min a 200 rpm) e centrifugação (13 min a 6000 rpm).

Tabela 19. Ensaios de adição e recuperação para determinação de sulfonamidas totais em amostras de carne bovina.

Amostras	Sulfonamidas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)
A	66,7	66,7	100,0 \pm 0,5	100,0	81,8	81,8 \pm 0,1
B	66,7	55,6	83,3 \pm 0,3	100,0	72,7	72,7 \pm 0,2
C	66,7	57,1	85,7 \pm 0,1	100,0	72,7	72,7 \pm 0,2
D	66,7	47,6	71,4 \pm 0,2	100,0	81,8	81,8 \pm 0,1
E	66,7	57,1	85,7 \pm 0,4	100,0	90,9	90,9 \pm 0,2
F	66,7	57,1	85,7 \pm 0,1	100,0	88,9	88,9 \pm 0,2
G	66,7	66,7	100,0 \pm 0,2	100,0	88,9	88,9 \pm 0,2

Os resultados obtidos (Tabela 19) apresentaram valores de recuperações entre 71,4 e 100,0%, indicando a ausência de efeitos de matriz, e demonstrando a precisão do procedimento desenvolvido.

Na Tabela 20 são apresentados diferentes procedimentos analíticos para determinação de sulfonamidas em alimentos de origem animal e que são comparados com o procedimento proposto.

Tabela 20. Características analíticas de métodos de microextração para determinação de sulfonamidas em amostras de carne bovina.

Número de analitos	Amostra	Extração/preparo de amostra	Técnica analítica	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referências
8 SAs	Porco, frango e carne bovina	ACN and SPE-CE (Sep-Pak Alumina N, Oasis HLB)	CE-DAD	5,0-10,0	80-97	(FUH; CHU, 2003)
17 SAs	Músculo bovino, suíno e de frango	Na_2SO_4 , ACN, metanol e n-hexano	HPLC-MS/MS	0,03-3,0	70-110	(YAMADA et al., 2006)
9 SAs	Músculo de aves e bovinos	Metanol, ácido fórmico em ACN e MSPD	HPLC-MS/MS	25,0-50,0	19-29	(BITTENCOURT et al., 2012)
13 SAs	Músculo de aves, bovinos e suínos	Acetona/ diclorometano, ácido acético e SPE (ácido sulfônico aromático)	HPLC-MS/MS	56,2-66,5	90-110	(VARENINA et al., 2016)
10 SAs	Carne suína, bovina e de frango, tripa bovina e fígado de porco	QuEChERS	HPLC-MS/MS	0,01-0,03	87-100	(WEN; LIN; FUH, 2017)
15 SAs	Tecidos de carne suína, bovina e de carneiro	ACN	HPLC-UV	6,5-11,0	82-94	(HUI et al., 2018)
Sulfadimetoxina	Frango e carne bovina	Biossensor baseado em aptâmero e PGE	Biossensor eletroquímico	$1,1 \times 10^{-7}$	93-103	(MOHAMMAD-RAZDARI et al., 2019)
8 SAs	Frango, cordeiro e carne bovina	ACN, ácido fórmico e DSPE estrutura metálica orgânica estável e mesoporosa	HPLC-UV	0,7-6,5	83-104	(XIA et al., 2020)
3 SAs	Carne bovina	1-butanol	Medidas digitais	10,0	71-100	Este trabalho

ACN: acetonitrila; CE: eletroforese capilar; DAD: detector de arranjo de diodos; DSPE: extração em fase sólida dispersiva; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; LD: limite de detecção; MS/MS: espectrometria de massa em modo tandem; MSPD: dispersão em fase de matriz sólida; PGE: Eletrodo de Grafite Pirofítico; QuEChERS: Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro; SAs: sulfonamidas; SPE: extração em fase sólida; UV: ultravioleta.

Os métodos de pré-concentração de SAs de carne bovina incluem SPE (VARENINA et al., 2016), DSPE (XIA et al., 2020), QuEChERS (WEN; LIN; FUH, 2017), MSPD (BITTENCOURT et al., 2012), entre outros usados para diferentes tecidos animais (DENG et al., 2016; GOVIND et al., 2018; LIU; TONG; ZHANG, 2020; NASIR et al., 2019). Em alguns casos, foram usados sorventes como alumina neutra (FUH; CHU, 2003), ácido sulfônico aromático (VARENINA et al., 2016), sorvente PSA (WEN; LIN; FUH, 2017) e areia do mar (BITTENCOURT et al., 2012). Estudos também sintetizaram novos sorventes baseados em compósitos magnéticos, como estruturas metálicas orgânicas (MOFs) (XIA et al., 2017, 2020), polímeros orgânicos (MOGA et al., 2020) ou biossensores eletroquímicos (MOHAMMAD-RAZDARI et al., 2019) e os aplicaram nas etapas de limpeza e pré-concentração. Em geral, os métodos baseados na SPE utilizam cartuchos adsorventes caros e que raramente são reutilizados. Além disso, o desenvolvimento destes materiais é laborioso, reduzindo a aplicabilidade em laboratórios em análises de rotina. Embora os métodos de extração apresentados sejam altamente eficientes na partição dos analitos, muitos empregam exaustivas lavagens na etapa de limpeza da amostra utilizando grandes volumes de solventes orgânicos como n-hexano (YAMADA et al., 2006), metanol (BITTENCOURT et al., 2012; YAMADA et al., 2006), acetonitrila (BITTENCOURT et al., 2012; FUH; CHU, 2003; HUI et al., 2018; XIA et al., 2020; YAMADA et al., 2006) ou misturas de solventes como acetona-diclorometano-ácido acético (VARENINA et al., 2016) e ácido acético-acetonitrila (WEN; LIN; FUH, 2017) para partição das SAs de amostras de carne bovina. Também foram reportados estudos em que o solvente precisa ser evaporado em temperaturas elevadas, sob pressão reduzida e sob fluxo de nitrogênio constante (HUI et al., 2018). Contudo, em atenção à Química Analítica Verde, o uso destes solventes é fortemente desincentivado por serem potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente. O procedimento proposto sobressai às desvantagens mencionadas pois, além de dispensar a etapa de limpeza da amostra, o método emprega apenas 275 µL de solvente orgânico ambientalmente correto (1-butanol) para extração dos analitos, gerando 335 µL de resíduo por amostra.

As técnicas analíticas mais difundidas na determinação de SAs em carne bovina utilizam HPLC-UV (HUI et al., 2018; XIA et al., 2020) e HPLC-MS/MS (BITTENCOURT et al., 2012; VARENINA et al., 2016; WEN; LIN; FUH, 2017; YAMADA et al., 2006). Em outros estudos, também foram empregados sistemas de eletroforese capilar equipados com detector de arranjo de diodos (CE-DAD) (FUH; CHU, 2003), e técnicas eletroquímicas e espectroscópicas (MOHAMMAD-RAZDARI et al., 2019). Embora seja possível a separação individual dos analitos, com alta sensibilidade e baixo limite de detecção, estas técnicas são

onerosas, morosas, e requerem considerável experiência operacional do analista. Em comparação com outros métodos de análise de SAs em alimentos de origem animal, destaca-se o procedimento analítico desenvolvido, que apresenta vantagens como: a não necessidade de limpeza da amostra, a possibilidade de explorar as medidas digitais para a quantificação de SAs em carne bovina com equipamentos acessíveis e práticos, como o smartphone, o baixo consumo de reagentes (60 μL) e de solvente orgânico ecologicamente correto (275 μL de 1-butanol), e o pouco tempo dispendido na execução das análises (ca. 74 vezes menor ao observado na literatura) (BITTENCOURT et al., 2012; FUH; CHU, 2003; HUI et al., 2018; MOHAMMAD-RAZDARI et al., 2019; VARENINA et al., 2016; WEN; LIN; FUH, 2017; XIA et al., 2020; YAMADA et al., 2006). Ainda, a partir de 750 mg de carne moída, quantidade 7 vezes inferior comparado ao método por HPLC-MS/MS (BITTENCOURT et al., 2012; WEN; LIN; FUH, 2017) e HPLC-UV onde a etapa de limpeza da amostra também foi desnecessária (HUI et al., 2018), as características analíticas obtidas com o procedimento proposto foram satisfatórias, atingindo valores de recuperação dentro da faixa esperada (71-100%). Outro fator preponderante a ser considerado foi o baixo LD alcançado (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) que, apesar das limitações do método proposto, foi 10 vezes abaixo do LMR de SAs totais (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) permitido pela legislação vigente em alimentos de origem animal (ANVISA, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 1990). Considerando o exposto, o procedimento desenvolvido demonstrou ser alternativa limpa, prática, rápida, sensível, eficiente e economicamente viável para a determinação de sulfonamidas totais em amostras de carne bovina.

6. CONCLUSÕES

Os procedimentos de preparo de amostra baseados nas microextrações líquido-líquido dispersiva e sólido-líquido dispersiva, propostos para extração e pré-concentração de sulfonamidas totais de amostras de leite e carne bovina, mostraram ser alternativas eficientes, sensíveis, seletivas, precisas, práticas e ecologicamente corretas em comparação com os demais procedimentos dispostos na literatura.

O procedimento DLLME foi avaliado quanto ao efeito de espécies potencialmente interferentes na determinação das sulfonamidas totais. Os efeitos dos interferentes foram individualmente avaliados na presença e ausência das espécies através de ensaios de adição e recuperação cujo resultados apresentaram recuperações entre 80 e 114%, podendo-se concluir que tais espécies, mesmo em concentrações significativamente elevadas às encontradas nas amostras, não causaram interferência no procedimento proposto demonstrando a seletividade do método.

Em comparação com outros métodos de análises de sulfonamidas em leite e carne bovina, os procedimentos propostos apresentaram vantagens alinhadas aos preceitos da Química Analítica Verde como o baixo consumo de reagentes e de solvente orgânico ecologicamente correto. Para amostras de leite, foram requeridos apenas 0,5 mL de amostra, 2,75 mL de reagentes e 0,5 mL de solvente, gerando 3,75 mL de resíduos por determinação. Além disso, o procedimento DLLME proposto permitiu a determinação simultânea de 12 amostras em aproximadamente 40 minutos, alcançando limite de detecção 5 vezes inferior ao LMR recomendado pelos órgãos regulamentadores.

Para amostras de carne, além da não necessidade de limpeza da amostra, o procedimento proposto requereu apenas 750 mg de amostra, 60 µL de reagentes e 275 µL de solvente, gerando 335 µL de resíduo por determinação. O procedimento DSLME proposto permitiu a determinação simultânea de 6 amostras em apenas 26 minutos, alcançando limite de detecção concordante com o apresentado na literatura por técnicas cromatográficas e 10 vezes inferior ao LMR estabelecido pela legislação vigente.

Outra vantagem a ser destacada pelos procedimentos propostos foi a possibilidade de explorar as medidas de imagens digitais para a quantificação de sulfonamidas totais em leite e carne bovina com equipamentos acessíveis, práticos e atrativos em relação ao custo e tempo de análise, como o smartphone, tornando possível a aplicação direta em campo.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, H. et al. Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry (hybrid linear ion trap-Orbitrap). **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 61–72, ago. 2014.
- ABIA. **Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. : Faturamento 2018**, 2017. Disponível em: <<https://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2018.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2022
- ABLV. **Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida. : Relatório Anual 2017**. São Paulo, SP, 2018. Disponível em: <<https://ablv.org.br/wp-content/uploads/2020/10/ABLV-Relatorio-Anual-2017.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2022
- ACEVEDO, M. S. M. S. F. et al. A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 259–263, dez. 2018.
- AGARWAL, S. P.; WALASH, M. I.; BLAKE, M. I. Spectrophotometric titration of sulfonamides with bromate-bromide solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 779–781, maio 1972.
- AGARWAL, V. K. A high performance liquid chromatographic method for the determination of nine sulfonamides in milk. Em: **Analysis of Antibiotic/Drug Residues in Food Products of Animal Origin**. Boston, MA: Springer US, 1992a. p. 165–172.
- AGARWAL, V. K. High performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1–2, p. 411–423, out. 1992b.
- 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, n. 17, p. 3793–3799, nov. 1993.
- AHMADI-JOUBARI, T.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 94, p. 145–151, jun. 2014.
- ALABURDA, J. et al. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1587–1592, nov. 2007.
- ALSHANA, U. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with counter-electroosmotic flow normal stacking mode in capillary electrophoresis for the determination of bisphenol a in water and urine samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 20, p. 2855–2870, dez. 2013.
- ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167–175, set. 1999.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. CHARLES. **Green chemistry: theory and practice**. [s.l.] Oxford University Press, 1998.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–31, abr. 2003.

ANDRADE, L. S. et al. Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 13, p. 1475–1480, jul. 2009.

ANDRUCH, V. et al. Five years of dispersive liquid-liquid microextraction. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 48, n. 3, p. 161–259, abr. 2013.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) No. 253, de 16 de setembro de 2003, estabelece o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet)**. Brasília, Distrito Federal: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-01/pamvet.pdf>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

ARROYO-MANZANARES, N.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 143, p. 459–464, jan. 2014.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, JANUSZ. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, out. 1990.

ASENSIO-RAMOS, M. et al. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7415–7437, out. 2011.

AYAD, M.; AZIZ, L. A. EL; KHEIR, A. EL. Atomic absorption determination of certain sulfonamides via their metal complexes. **Analytical Letters**, v. 16, n. 16, p. 1335–1342, jan. 1983.

BANAN, K. et al. MIP-based extraction techniques for the determination of antibiotic residues in edible meat samples: Design, performance & recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 164–178, jan. 2022.

BARAN, W. et al. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 196, p. 1–15, nov. 2011.

BEHBAHANI, M. et al. Application of surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for preconcentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 25–31, set. 2013.

BERIJANI, S. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, n. 1, p. 1–9, ago. 2006.

BEVIL, R. F. Sulphonamides. Em: [s.l.] In: JUKES T. H.; DUPONT, H. L.; CRAWFORD, L. M. (Ed.). Section D, antibiotics, sulphonamides, and public health. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 355–365.

- BIEGANOWSKA, M. L.; PETRUCZYNIK, A. Thin-layer and column chromatography of sulfonamides on aminopropyl silica gel. **Chromatographia**, v. 43, n. 11–12, p. 654–658, dez. 1996.
- BITAS, D. et al. Food sample preparation for the determination of sulfonamides by high performance liquid chromatography: State of the art. **Separations**, v. 5, n. 2, p. 31, jun. 2018.
- BITTENCOURT, M. S. et al. High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure. **Food Addit. Contam., Part A**, v. 29, n. 4, p. 508–516, abr. 2012.
- BRASIL. **Decreto No 8.840, de 24 de agosto de 2016**. . **Diário Oficial da União**, 25 ago. 2016. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/decreto-lei-e-lei/decreto-federal-no-8840-de-24-08-2016.pdf/view>>. Acesso em: 21 fev. 2022
- BRINKMANN, S. Leite e modernidade: ideologia e políticas de alimentação na era Vargas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 21, n. 1, p. 263–280, jan. 2014.
- BURATO, J. S. S. et al. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 1, p. 202–225, jan. 2020.
- CARRASCO-CORREA, E. J. et al. Smart materials for solid-phase extraction applications. Em: **Handbook of Smart Materials in Analytical Chemistry**. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd, 2019. p. 531–580.
- CATELANI, T. A. **Desenvolvimento de sistemas de screening automatizados para determinação de sulfonamidas em mel e procedimento limpo para a quantificação de sulfaquinoxalina em medicamentos veterinários**. Araraquara-SP: Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP), 2013.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, jun. 2008.
- CHUNG, H.-H. et al. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 297–301, mar. 2009.
- CICARNE. **A pecuária de corte mundial em números. Centro de Inteligência da Carne Bovina, Embrapa Gado de Corte. Boletins**, 2021. Disponível em: <<https://www.cicarne.com.br/wp-content/uploads/2021/07/Boletim-CiCarne-48-2021.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2022
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Regulation No. 2377/90, 26 June 1990. Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin**. . **Official Journal of the European Communities**, 1990. Disponível em: <<http://extwprlegs1.fao.org/docs/texts/eur18519.doc>>. Acesso em: 21 fev. 2022
- CONAB. **Oferta de demanda de carnes. Companhia Nacional de Abastecimento**, nov. 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado->

agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/oferta-e-demanda-de-carnes/>. Acesso em: 16 fev. 2022

CRUZ-VERA, M. et al. One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 37, p. 6459–6465, set. 2009.

DAI, T. et al. Determination of sulfonamide residues in food by capillary zone electrophoresis with on-Line chemiluminescence detection based on an Ag(III) complex. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1286, jun. 2017.

DE MARCO, B. A. et al. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 1, p. 1–8, jan. 2019.

DENG, K. et al. Determination of sulfonamide residues in chicken liver using high-performance liquid chromatography. **Food Anal. Methods**, v. 9, n. 12, p. 3337–3344, 10 dez. 2016.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Method validation for the determination of the antibiotics residues oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by high performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 1–10, jun. 2004.

DIEZ, N. M. et al. Fluorimetric determination of sulphaguanidine and sulphamethoxazole by host-guest complexation in β -cyclodextrin and partial least squares calibration. **Journal of Fluorescence**, v. 17, n. 3, p. 309–318, maio 2007.

DÍEZ, R.; SARABIA, L.; ORTIZ, M. C. Optimization of analytical conditions and validation of a fluorescence method for the determination of sulfadiazine in milk. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 4, p. 957–968, jun. 2007.

DMITRIENKO, S. G. et al. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 6–25, nov. 2014.

DUARTE, J. S.; DORES, E. F. G. C.; VILLA, R. D. Ultrasound vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USVA-DLLME) applied to the determination of the triazole flutriafol and triazines and triazinones pesticides in water. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 925–931, jun. 2016.

EMBRAPA. Qualidade da carne bovina. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2020.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2021: saúde única e total.** . **Embrapa Gado de Leite**. Brasília, DF, 2021a. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>>.

Acesso em: 1 fev. 2022

EMBRAPA. Estudos socioeconômicos e ambientais. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, jun. 2021b.

ESTEVE-ROMERO, J. S. et al. Micellar enhanced spectrophotometric determination of organic species. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 29–37, jan. 1995.

EUROPEAN COMMISSION. **European Community Commission Regulation (EEC) No 2377/1990 EEC laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.** Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_en.pdf>. Acesso em: 5 maio. 2021.

- EVGEN'EV, M. I.; GARMONOV, S. YU.; SHAKIROVA, L. SH. Flow-injection determination of sulfanilamides in drugs and biological fluids with spectrophotometric detection. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 64–70, jan. 2002.
- FAN, Y. et al. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, p. 108829, fev. 2021.
- FAO. **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization, 2013.
- FELTRIN, C. W. et al. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, fev. 2007.
- FERNANDES, F. C. B. **Desenvolvimento de métodos limpos para screening e determinação de sulfonamidas em matrizes diversas**. Araraquara: Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP), 2011.
- FERNANDES, F. C. B. et al. Screening and determination of sulphonamide residues in bovine milk samples using a flow injection system. **Food Chemistry**, v. 166, p. 309–315, jan. 2015.
- FERNÁNDEZ, P. et al. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 88–96, mar. 2013.
- FERNÁNDEZ, P. et al. Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for ultra-performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in urine and hospital wastewater. **Anal. Methods**, v. 6, n. 20, p. 8239–8246, ago. 2014.
- FERREIRA, R. G. et al. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 2, p. 30–49, 2012.
- FUH, M.-R. S.; CHU, S.-Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, v. 499, n. 1–2, p. 215–221, dez. 2003.
- FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, n. 2, p. 255–259, abr. 2003.
- 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, n. 7, p. 1031–1033, dez. 2001.
- FURUSAWA, N.; KISHIDA, K. Toxic/Harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulfonamides in meat. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 17, p. 2931–2939, out. 2003.
- GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, out. 2013.
- GAO, S. et al. Ultrasound-assisted ionic liquid/ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of sulfonamides in infant formula milk powder using high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 99, p. 875–882, set. 2012.

- GDP. **Global Dairy Platform. Annual Review 2016**. Rosemont, IL, 2017. Disponível em: <<https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/uploads/2018/04/2016-annual-review-final.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2022
- GOVIND, V. et al. Determination of sulfadoxine residues in poultry meat by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **J. Entomol. Zool. Stud.**, v. 6, n. 2, p. 2580–2584, fev. 2018.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, abr. 2010.
- GUO, L.; LEE, H. K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 31, p. 5040–5046, ago. 2011.
- GUO, X. et al. Ionic liquid-based single-drop liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in environmental water. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 3, p. 452–458, fev. 2012.
- HERRERA-HERRERA, A. V. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 728–751, jul. 2010.
- HOU, X.-L. et al. Multi-walled carbon nanotubes–dispersive solid-phase extraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of 18 sulfonamides in pork. **Journal of Chromatography B**, v. 929, p. 107–115, jun. 2013.
- HUANG, X.; QIU, N.; YUAN, D. Simple and sensitive monitoring of sulfonamide veterinary residues in milk by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and high performance liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 8240–8245, nov. 2009.
- HUI, W. et al. Rapid screening for 15 Sulfonamide residues in foods of animal origin by high performance liquid chromatography–UV method. **Journal of Chromatographic Science**, v. 56, n. 7, p. 636–643, ago. 2018.
- HUO, X. et al. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of six fungicides in fruit samples by GC–ECD. **Chromatographia**, v. 73, n. 3–4, p. 313–319, fev. 2011.
- IBARRA, I. S. et al. Magnetic solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of sulphonamides in milk samples. **Food Chemistry**, v. 157, p. 511–517, ago. 2014.
- IBGE. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária**. . Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasília, DF, mar. 2020. Disponível em: <https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_202004caderno.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2022
- JANK, L. et al. β -lactam antibiotics residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid–liquid extraction method. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 4, p. 497–507, abr. 2012.
- JIA, S. et al. Combined application of dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and

sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 204–213, dez. 2013.

KABIR, A.; LOCATELLI, M.; ULUSOY, H. Recent trends in microextraction techniques employed in analytical and bioanalytical sample preparation. **Separations**, v. 4, n. 4, p. 36, dez. 2017.

KARAGEORGOU, E. et al. Fabric phase sorptive extraction for the fast isolation of sulfonamides residues from raw milk followed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Food Chemistry**, v. 196, p. 428–436, abr. 2016.

KECHAGIA, M. et al. **HPLC method development and validation for the determination of sulfonamides residues in milk samples**. 3rd IMEKOFOODS Conference: Metrology Promoting Harmonization and Standardization in Food and Nutrition. **Anais...**Grécia: out. 2017.

KECHAGIA, M.; SAMANIDOU, V. Trends in microextraction-based methods for the determination of sulfonamides in milk. **Separations**, v. 4, n. 3, p. 23, jun. 2017.

KIAROSTAMI, V. et al. Binary solvents dispersive liquid-liquid microextraction (BS-DLLME) method for determination of tramadol in urine using high performance liquid chromatography. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 25, dez. 2014.

KOCÚROVÁ, L. et al. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchemical Journal**, v. 102, p. 11–17, maio 2012.

KWON, O.; PARK, T. Applications of smartphone cameras in agriculture, environment, and food: a review. **J. Biosyst. Eng.**, v. 42, n. 4, p. 330–338, dez. 2017.

LAGO, C. L.; SANTANA, M. A. **Determination of sulfonamides in commercial veterinary formulations by CE-MS/MS**. **Agilent Technologies, Inc.**, nov. 2016. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7682EN.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2021

LEONG, M.-I.; FUH, M.-R.; HUANG, S.-D. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 2–14, mar. 2014.

LEONG, M.-I.; HUANG, S.-D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1–2, p. 8–12, nov. 2008.

LI, Y. et al. Fabrication of CoFe₂O₄-graphene nanocomposite and its application in the magnetic solid phase extraction of sulfonamides from milk samples. **Talanta**, v. 144, p. 1279–1286, nov. 2015.

LIMA, L. C.; PAPAI, R.; GAUBEUR, I. Butan-1-ol as an extractant solvent in dispersive liquid-liquid microextraction in the spectrophotometric determination of aluminium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 175–181, dez. 2018.

LIMA, M. J. A. et al. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105042, set. 2020.

LIMA, M. J. A.; NASCIMENTO, C. F.; ROCHA, F. R. P. Feasible photometric measurements in liquid–liquid extraction by exploiting smartphone-based digital images. **Analytical Methods**, v. 9, n. 14, p. 2220–2225, mar. 2017.

LIU, X.; TONG, Y.; ZHANG, L. Tailorable yolk-shell Fe₃O₄ graphitic carbon submicroboxes as efficient extraction materials for highly sensitive determination of trace sulfonamides in food samples. **Food Chemistry**, v. 303, n. August 2019, p. 125369, jan. 2020.

LOPES, R. P. et al. Development and validation (according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 606, jan. 2011a.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1–10, ago. 2011b.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of an efficient and innovative method for the quantification of multiclass veterinary drugs in milk by using LC–MS/MS analysis. **Analytical Methods**, v. 5, n. 19, p. 5121, 2013.

LU, K.-H.; CHEN, C.-Y.; LEE, M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1082–1087, 15 maio 2007.

MACEDO, A. N. DE. **Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino**. São Carlos-SP: Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP), abr. 2012.

MAMANI, M. C. V. **Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. Campinas-SP: Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP), mar. 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC/Animal. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 213, 1999.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Leite tipo A, leite cru refrigerado, leite pasteurizado, coleta de leite cru refrigerado e transporte a granel. **Diário Oficial da União**, p. 6, 2011.

MAPA. **Plano mais pecuária**. . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Ação Estratégica. Brasília-DF, 2014. Disponível em: <https://www.agricultura.gov.br/files/docs/pecuaria/mais_pecuaria.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2022

MAPA. **Instrução Normativa N° 51, de 19 de dezembro de 2019**. . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/instrucao-normativa-2019_51-anvisa.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2022

- MAPA. **Mapa do leite: políticas públicas e privadas para o leite.** . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Governo Federal, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>>. Acesso em: 4 fev. 2022
- MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80, fev. 2015.
- MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, out. 2013.
- MARTINS, M. L. et al. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 29–45, 2012.
- MARTINS, M. T. et al. A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p. 374–383, nov. 2014.
- MAUDENS, K. E.; ZHANG, G.-F.; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, n. 1, p. 85–92, ago. 2004.
- MEDINA, A. R.; GARCÍA, M. C. C.; DÍAZ, A. M. A flow analysis system for the rapid determination of sulfonamides using a solid phase photometric sensing zone. **Analytical Letters**, v. 35, n. 2, p. 269–282, fev. 2002.
- MITSCHER, L. A.; LEMKE, T. L.; GENTRY, E. J. Antibiotics and antimicrobial agents. **Foye’s Principles of medicinal chemistry**, v. 5, p. 788–791, 2002.
- MOATS, W. A. Physicochemical methods for identifying antibiotic residues in foods. Em: **Agricultural Uses of Antibiotics**. ACS Symposium Series ed. [s.l: s.n.]. v. 320.p. 154–167.
- MOGA, A. et al. Poly(ethylene glycol) diacrylate-based solid-phase extraction for determination of sulfonamides in meat samples. **Microchem. J.**, v. 157, n. April, p. 104931, set. 2020.
- MOHAMMAD-RAZDARI, A. et al. Detection of sulfadimethoxine in meat samples using a novel electrochemical biosensor as a rapid analysis method. **J. Food Compost. Anal.**, v. 82, n. June, p. 103252, set. 2019.
- MONTANARO, A. Sulfonamide Allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 18, n. 4, p. 843–850, nov. 1998.
- MONTERO, R.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Indirect atomic absorption spectrometric determination of sulphonamides in pharmaceutical preparations and urine by continuous precipitation. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 3, n. 5, p. 725–729, ago. 1988.
- MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. DE. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186–204, 2014.
- MOTA, C. V. **Consumo de carne nos últimos 16 anos.** **BBC News**, 15 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-59653752>>. Acesso em: 16 fev. 2022
- MSAGATI, T. Voltammetric detection of sulfonamides at a poly(3-methylthiophene) electrode. **Talanta**, v. 58, n. 3, p. 605–610, set. 2002.

- NAGARAJA, P. et al. A new, sensitive, and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfa drugs. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 85, n. 4, p. 869–874, jul. 2002.
- NAGARAJA, P. et al. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, n. 3, jan. 2007.
- NASCIMENTO, C. F.; ROCHA, D. L.; ROCHA, F. R. P. A fast and environmental friendly analytical procedure for determination of melamine in milk exploiting fluorescence quenching. **Food Chemistry**, v. 169, p. 314–319, fev. 2015.
- NASIR, A. N. M. et al. Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products. **Food Chem.**, v. 276, n. October 2018, p. 458–466, mar. 2019.
- NESTERENKO, I. S.; NOKEL, M. A.; EREMIN, S. A. Immunochemical methods for the detection of sulfanylamide drugs. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 435–444, maio 2009.
- NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. Nonmessenger targets for drug action III: Exogenous pathogens and toxins. Em: **Medicinal chemistry: A molecular and biochemical approach**. Oxford, EN: Oxford University Press, 2005. p. 543–599.
- OECD/FAO. **Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. OECD-FAO Agricultural Outlook”, Meat Consumption**, 2020. Disponível em: <<https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2022
- OUYANG, G.; PAWLISZYN, J. Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 692–703, jul. 2006.
- PASTOR-NAVARRO, N.; MAQUIEIRA, Á.; PUCHADES, R. Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 907–920, out. 2009.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. et al. An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. **Talanta**, v. 182, p. 1–21, maio 2018.
- PLÓTKA-WASYLKA, J. et al. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19–38, nov. 2015.
- PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chem.**, v. 16, n. 10, p. 4546–4551, jul. 2014.
- PRESTES, O. D. et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 697–710, mar. 2013.
- QUIGLEY, A.; CUMMINS, W.; CONNOLLY, D. Dispersive liquid-liquid microextraction in the analysis of milk and dairy products: A review. **Journal of Chemistry**, v. 2016, p. 1–12, out. 2016.
- RAMOS, G. R.; ROMERO, J. S. E.; ALVAREZ-COQUE, M. C. G. Colorimetric determination of arylamines and sulphonamides by diazotization and coupling in a micellar solution. **Analytica Chimica Acta**, v. 223, p. 327–337, 1989.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- RATENI, G.; DARIO, P.; CAVALLO, F. Smartphone-based food diagnostic technologies: a review. **Sensors**, v. 17, n. 6, p. 1453, jun. 2017.

- REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, maio 2006.
- REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, abr. 2010.
- REZAEI, F. et al. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, n. 2–3, p. 621–627, 30 out. 2008.
- RODRÍGUEZ-CABO, T. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography–mass spectrometry determination of fungicides in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6603–6611, set. 2011.
- RÜBENSAM, G. et al. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, n. 1–2, p. 24–29, out. 2011.
- SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESHI, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with p-dimethylaminocinnamaldehyde: Application to bulk drug and dosage forms. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1867–1871, dez. 1993.
- SANDRA, P.; DAVID, F.; VANHOENACKER, G. Advanced sample preparation techniques for the analysis of food contaminants and residues. Em: **Advanced Sample Preparation Techniques**. [s.l.] Comprehensive Analytical Chemistry, 2008. v. 51. p. 131–174.
- SANTANA, A.; SANTANA, M.; PEREIRA, P. Development of a method based on DLLME and UFLC-DAD for the determination of antibiotics in honey samples and the study of their degradation kinetics. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 29, n. 7, p. 1538–1550, 2018.
- SANTOS ANDRADE, L. et al. A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 2, n. 4, p. 402, fev. 2010.
- SANTOS, J. R. M. P. **Desenvolvimento de metodologias para a determinação de resíduos de sulfonamidas em leite UHT**. Rio de Janeiro-RJ: Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, 2015.
- SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 1–14, jan. 2010.
- SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2027–2066, mar. 2014.
- SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K.; BIDGOLI, A. A. H. Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 7, p. 2149–2158, jun. 2011.

- SCHENCK, F. J.; CALLERY, P. S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1–2, p. 99–109, jul. 1998.
- SCHWAIGER, B.; KÖNIG, J.; LESUEUR, C. Development and validation of a multi-class UHPLC-MS/MS method for determination of antibiotic residues in dairy products. **Food Anal. Methods**, v. 11, n. 5, p. 1417–1434, maio 2018.
- SHI, Z. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of anthraquinone derivatives in human urine after oral administration of San-Huang tablets. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, n. 14, p. 2062–2071, ago. 2014.
- SILVA, A. F. S.; GONÇALVES, I. C.; ROCHA, F. R. P. Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. **Food Control**, v. 125, p. 107956, jul. 2021.
- SILVA, A. F. S.; ROCHA, F. R. P. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. **Food Control**, v. 115, p. 107299, set. 2020.
- SILVA, E. P. **Validação de método de extração e análise multirresíduo de medicamentos veterinários em amostras de leite e ovos por LC-MS/MS**. Brasília-DF: Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-UnB), 2013.
- SILVA, M. F. **Produção de leite no mundo: 10 maiores produtores de leite**. Disponível em: <<http://www.farmnews.com.br/pesquisa/10-maiores-produtores-de-leite/>>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- SIQUEIRA, K. **Reflexões sobre o nível de consumo de leite do brasileiro**. . **Milkpoint**, set. 2019a. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/kennya-siqueira/reflexoes-sobre-o-nivel-de-consumo-de-leite-do-brasileiro-215950/>>. Acesso em: 6 fev. 2022
- SIQUEIRA, K. B. **O mercado consumidor de leite e derivados**. Juiz de Fora-MG: Embrapa, jul. 2019b. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199791/1/CT-120-MercadoConsumidorKennya.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2022.
- SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Spot test for determination of uric acid in saliva by smartphone-based digital images: A new proposal for detecting kidney dysfunctions. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105862, mar. 2021.
- SPIETELUN, A. et al. Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1321, p. 1–13, dez. 2013.
- STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 135–141, jan. 1999.
- SU, S. et al. HPLC determination of sulfamethazine in milk using surface-imprinted silica synthesized with iniferter technique. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 1141–1146, set. 2008.
- SU, Y.-S.; JEN, J.-F. Determination of organophosphorous pesticides in water using in-syringe ultrasound-assisted emulsification and gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 31, p. 5043–5049, jul. 2010.
- TOALDO, I. M. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite por CLAE-FL/DAD e CLAE-**

- MS/MS.** Florianópolis-SC: Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2011.
- TOLIKA, E. P.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. An overview of chromatographic analysis of sulfonamides in pharmaceutical preparations and biological fluids. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 3, p. 198–212, ago. 2010.
- TOLIKA, E. P.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and validation of an HPLC method for the determination of ten sulfonamide residues in milk according to 2002/657/EC. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 14, p. 1627–1635, jul. 2011.
- TUBAON, R. M.; HADDAD, P. R.; QUIRINO, J. P. High-sensitivity analysis of anionic sulfonamides by capillary electrophoresis using a synergistic stacking approach. **J. Chromatogr. A**, v. 1349, p. 129–134, jul. 2014.
- USDA. **United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service.** Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>>. Acesso em: 15 fev. 2022.
- VARENINA, I. et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in muscle, egg, milk and honey. **Food Addit. Contam., Part A**, p. 1–12, mar. 2016.
- VERMA, K. K.; GUPTA, A. K. Determination of sulfa drugs with chloramine-T. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 249–253, fev. 1982.
- WANG, J. et al. Developing microwave-assisted ionic liquid microextraction for the detection and tracking of hydrophobic pesticides in complex environmental matrices. **RSC Advances**, v. 3, n. 38, p. 17113, jul. 2013.
- WANG, S. et al. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 4, p. 362–384, abr. 2006.
- WEN, C.-H.; LIN, S.-L.; FUH, M.-R. Determination of sulfonamides in animal tissues by modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 164, p. 85–91, mar. 2017.
- WEN, Y. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design. **Electrophoresis**, v. 32, n. 16, p. 2131–2138, ago. 2011.
- XIA, L. et al. Towards the determination of sulfonamides in meat samples: A magnetic and mesoporous metal-organic framework as an efficient sorbent for magnetic solid phase extraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1500, p. 24–31, jun. 2017.
- XIA, L. et al. Adsorption behavior of a metal organic framework of University in Oslo 67 and its application to the extraction of sulfonamides in meat samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1619, p. 460949, maio 2020.
- XU, X. et al. Ionic liquid-based microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization of sulfonamides in river water, honey, milk, and animal plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 707, n. 1–2, p. 92–99, nov. 2011.
- YAMADA, R. et al. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray

ionization tandem mass spectrometry. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v. 70, n. 1, p. 54–65, jan. 2006.

YAO, T.; DU, K. Simultaneous determination of sulfonamides in milk: In-situ magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127342, nov. 2020.

YAZDANFAR, N.; SHAMSIPUR, M.; GHAMBARIAN, M. Determination of sulfonamide residues in animal foodstuffs by magnetic dispersive solid-phase extraction using magnetic carbon nanocomposites coupled with ion pair-dispersive liquid-liquid micro-extraction combined with HPLC-DAD. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 1433–1442, jun. 2021.

YU, C.; HU, B. C18-coated stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of sulfonamides in milk and milk powder. **Talanta**, v. 90, p. 77–84, fev. 2012.

YU, H. et al. Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animal origin. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 25, p. 2653–2662, set. 2011.

YU, H.; MU, H.; HU, Y.-M. Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC–DAD. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 76–81, fev. 2012.

ZANG, X.-H. et al. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161–168, fev. 2009.

ZHANG, H.; WANG, S. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. **Journal of Immunological Methods**, v. 350, n. 1–2, p. 1–13, out. 2009.

ZHAO, R.-S. et al. Ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 7, p. 830–836, abr. 2011.