

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

VALÉRIA LOPES FERREIRA VIANNA

Extração e pré-concentração em ponto nuvem de sulfonamidas em
amostras de leite bovino

Piracicaba

2021

VALÉRIA LOPES FERREIRA VIANNA

Extração e pré-concentração em ponto nuvem de sulfonamidas em
amostras de leite bovino

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Wanessa Melchert Mattos

Piracicaba

2021

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Vianna, Valéria Lopes Ferreira

Extração e pré concentração em ponto nuvem de sulfonamidas em amostras de leite bovino / Valéria Lopes Ferreira Vianna; Wanessa Melchert Mattos. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

52 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Leite 2. Ponto nuvem 3 Química verde 4. Sulfonamidas totais I. Título.

CDU (543.066 + 613.287.5) : 547.541.521

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

À Deus pela oportunidade de viver este momento e ser o primeiro mestre em minha vida. E a minha família pelos sorrisos e lágrimas derramados, pelo amor e força em todo período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e instituições que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Wanessa Melchert Mattos, pela oportunidade, paciência, confiança, e todo o conhecimento compartilhado durante o mestrado, sou muito grata por tudo.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura “CENA”, e aos professores da Pós-graduação em Química na Agricultura e no Ambiente, pelos ensinamentos em minha formação.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo e apoio à pesquisa.

Aos professores Marcos Y. Kamogawa e Marcelo E. Alves, e também as técnicas de laboratório do departamento de ciências exatas, ao colega Marcos Brasil pela parceria, amizade e momentos de descontração.

À Dayane Dresch pelo apoio, e disposição na condução do trabalho e pelos conhecimentos compartilhados.

À técnica Rita de Cássia do departamento de ciências exatas, que me apoiou, me ensinou e cuidou de mim durante todo o período de mestrado, meus mais sinceros sentimentos por tudo proporcionado nesta trajetória.

Aos amigos do grupo de estudos em química analítica verde pelo companheirismo, e por todos os momentos de convivência e ajuda.

Em especial quero agradecer à Juliana, Natalia, Karoline, Winston e Gabriel, com quem convivi durante esses dois anos, pela ajuda em todos os momentos do desenvolvimento do trabalho, e acima de tudo pela amizade de vocês.

Aos meus pastores Rinaldo e Meire Ito, pelas orações e assistência em minha vida.

Aos meus sogros, meus pais, meu marido e meu filho pela força, pela compreensão nos momentos de ausência e por todo amor dispensado por eles na minha vida.

Agradeço à Deus pela oportunidade de trilhar esta estrada desejada a tempos e realizar este sonho que se conquista.

*“Lembre de Deus em tudo
o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo.”*

Provérbios 3:6

RESUMO

VIANNA, V. L. F. **Extração e pré-concentração em ponto nuvem de sulfonamidas em amostras de leite bovino**. 2021. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

As sulfonamidas são antibióticos sintéticos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas em humanos e animais e permitidas, de acordo com órgãos regulamentadores de resíduos de antibióticos em concentrações de até $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de sulfonamidas totais (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina). Dentre os procedimentos utilizados no preparo de amostra para determinação de sulfonamidas estão as extrações líquido-líquido convencional e em fase sólida que empregam elevados volumes de solventes orgânicos. Neste contexto, foi desenvolvido um procedimento limpo de extração e pré-concentração em ponto nuvem sem utilização de solventes orgânicos para determinação de sulfonamidas totais em leite bovino. O procedimento experimental foi otimizado, alíquotas de 2 mL da amostra límpida, 2 mL da solução reagente e 1 mL de Triton X-114 7% (m/v) foram adicionadas em tubo, aquecidas em banho maria a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos e centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm. A determinação por imagens digitais foi realizada diretamente no tubo, sem remoção da fase pobre em surfactante. Resposta linear foi observada entre 10 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de sulfonamidas totais, descrita pela equação Sinal analítico = $2,50 + 0,0514 C$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) e $R = 0,999$. Limite de detecção e quantificação e o coeficiente de variação ($n = 11$) foram estimados em $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e 1,3%, respectivamente. As principais espécies concomitantes presentes na amostra não interferiram em concentrações usualmente encontradas. Estudos de adição e recuperação de sulfonamidas totais foram realizados em amostras de leite bovino UHT e pasteurizado obtendo porcentagens de recuperação entre 64 e 125%. O procedimento analítico desenvolvido apresenta sensibilidade adequada para a determinação de sulfonamidas totais em leite bovino e não emprega solventes orgânicos, atendendo aos preceitos da química analítica verde.

Palavras-chave: 1. Leite 2. Ponto nuvem 3 Química verde 4. Sulfonamidas totais.

ABSTRACT

VIANNA, V. L. F. **Extraction and preconcentration in a cloud point of sulfonamides in bovine milk.** 2021. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

Sulfonamides are synthetic antibiotics used to treat bacterial infections in humans and animals, which are allowed according to the regulatory agencies for antibiotic residues, up to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of total sulfonamides (sulfathiazole, sulfamethazine and sulfadimethoxine). The procedures used in sample preparation for sulfonamides determination include conventional liquid-liquid and solid-phase extractions, which use high volumes of organic solvents. In this context, a clean extraction and preconcentration procedure in a cloud point was developed without using organic solvents for determination of total sulfonamides in bovine milk. The experimental procedure was optimized, aliquots 2 mL of the clear sample, 2 mL of the reagent solution and 1 mL of Triton X-114 7% (w / v) were added in a tube, heated in a water bath at $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes and centrifuged for 20 minutes at 4000 rpm. The determination by digital images was performed directly in the tube, without removing the poor surfactant phase. A linear response was observed between 10 and $400 \mu\text{g L}^{-1}$ of total sulfonamides, described by the equation Analytical signal = $2.50 + 0.0514 C (\mu\text{g L}^{-1})$ and $R = 0.999$. Detection and quantification limits and coefficient of variation ($n = 11$) were estimated at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and 1.3%, respectively. The main concomitant species present in the sample did not interfere with concentrations usually found. Studies of spike and recovery of total sulfonamides were carried out on UHT and pasteurized bovine milk samples obtaining recovery percentages between 64 and 125%. The developed analytical procedure shows adequate sensitivity for the determination of total sulfonamides in bovine milk and does not use organic solvents, which meets the precepts of green analytical chemistry.

Keywords: Sulfonamides. Cloud point. Green analytical chemistry. Bovine milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica de uma sulfonamida	23
Figura 2 - Esquema da estrutura de um monômero de surfactante	25
Figura 3 - Equilíbrio dinâmico entre monômeros de surfactante e micela	26
Figura 4 - Procedimento de extração em ponto nuvem.....	27
Figura 5 - Artigos indexados no Science Direct com o termo “extração em ponto nuvem”	28
Figura 6 - Câmara empregada nas medidas RGB, visão (a) superior com abertura para tubo; (b) frontal e lateral e (c) interior pela câmera do smartphone.....	32
Figura 7 - Esquema do mecanismo da reação entre <i>p</i> -DAC e sulfametazina em meio ácido.....	35
Figura 8 - Espectro de absorção do sal imino formado entre a sulfonamida e o <i>p</i> -DAC	36
Figura 9 - Efeito da concentração de <i>p</i> -DAC sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais 100 µg L ⁻¹ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: SDS 0,02 mol L ⁻¹ , HCl 0,3 mol L ⁻¹ e Triton X-114 7% (m/v)	38
Figura 10 - Efeito da concentração de SDS sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais 100 µg L ⁻¹ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: <i>p</i> -DAC 0,3 mmol L ⁻¹ , HCl 0,3 mol L ⁻¹ e Triton X-114 7% (m/v).....	39
Figura 11 - Efeito da concentração de Triton X-114 (m/v) sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais 100 µg L ⁻¹ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: <i>p</i> -DAC 0,3 mmol L ⁻¹ , SDS 0,02 mol L ⁻¹ e HCl 0,3 mol L ⁻¹	40

Figura 12 - Efeito do tempo de incubação sobre o sinal analítico sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e Triton X-114 7% (m/v) 41

Figura 13 - Efeito do tempo de centrifugação sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, Triton X-114 7% (m/v) e tempo de incubação de 20 min..... 42

Figura 14 - Efeito do tempo de centrifugação sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, Triton X-114 7% (m/v) e tempo de incubação e centrifugação de 20 min 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sulfonamidas empregadas no controle de resíduos em leite.	24
Tabela 2 - Classificação de surfactantes conforme grupo hidrofílico.	26
Tabela 3 - Parâmetros otimizados da EPN e imagens digitais para determinação de sulfonamidas totais em leite bovino.	44
Tabela 4 - Características analíticas da EPN e imagens digitais para determinação de sulfonamidas totais em leite bovino.	45
Tabela 5 - Características analíticas de procedimentos com EPN para determinação de sulfonamidas.	46
Tabela 6 - Ensaio de adição e recuperação de sulfonamidas totais em amostras de leite bovino.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CMC - Concentração micelar crítica

CPE - Extração em ponto nuvem (do inglês *Cloud Point Extraction*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

LD - Limite de detecção

LED - Diodo emissor de luz (do inglês *Light Emitting Diode*)

LLE - Extração líquido-líquido (do inglês *Liquid-Liquid Extraction*)

LMR - Limite máximo de resíduos

LQ - Limite de quantificação

MCPE - Microextração em ponto nuvem (do inglês *Cloud Point Microextraction*)

p-DAC - *p*-dimetilaminocinamaldeído

PLS - Mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial Least Squares*)

PN - Ponto nuvem (do inglês *Cloud Point*)

RGB - Vermelho, verde e azul (do inglês *Red, Green e Blue*)

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDM - Sulfadimetoxina

SMZ - Sulfametazina

SPE - Extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)

SRM - Método padrão de referência (do inglês *Standard Reference Method*)

STZ - Sulfatiazol

Sulfa - Sulfonamidas

TCA - Ácido tricloroacético

UV/Vis - Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Sulfonamidas	22
1.2	Extração em Ponto Nuvem	24
1.3	Determinação de sulfonamidas por extração em ponto nuvem	28
1.4	Medidas Digitais	29
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	Equipamentos e acessórios.....	32
2.2	Reagentes e soluções	33
2.3	Procedimento Experimental.....	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1	Otimização do procedimento experimental.....	36
3.2	Avaliação das características analíticas	44
3.3	Efeito de espécies concomitantes	46
3.4	Análise de amostras de leite bovino	47
4	CONCLUSÕES.....	48
5	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento muito consumido e faz parte da alimentação humana desde os primeiros dias de vida, pois é rico em nutrientes, proteínas e minerais, além de ser um alimento funcional. Os componentes nutricionais são essenciais para a manutenção do organismo humano e auxiliam o combate à desnutrição em países menos desenvolvidos (AGOSTONI; TURCK, 2011).

O leite só pode ser comercializado se atender as normas direcionadas pelos órgãos do governo federal. Dentre elas, o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, segundo a instrução normativa N° 76 de 26 de novembro de 2018, destaca que “*o leite cru refrigerado não deve apresentar resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites máximos previstos em normas complementares*”

Os antimicrobianos são os medicamentos mais antigos empregados tanto na medicina humana quanto na veterinária. Começaram a ser utilizados em meados de 1940 misturados a ração de gados para evitar infecções (DE ALCÂNTARA-RODRIGUEZ et al., 2020; MAZUREK et al., 2015). Nos bovinos, a maior incidência de resíduos de antibióticos está no manejo inadequado de fármacos, utilizados no tratamento de mastites, onde por via úbere pode contaminar o leite.

A ingestão de leite que contenha a presença de resíduos de medicamentos veterinários, como as sulfonamidas, pode causar dores de cabeça, meningite, além de disfunções intestinais e resistência bacteriana (BANGERT; HASBUN, 2019; NERO et al., 2007). De acordo com o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo a instrução normativa N° 51 de 19 de dezembro de 2019, o limite máximo de resíduos totais para sulfonamidas não deve ultrapassar 100 mg kg⁻¹ de tecido animal ou 100 µg L⁻¹ de leite.

O método de análises recomendado para quantificação de sulfonamidas em leite de acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores de fluorescência e ultravioleta (ANVISA, 2009).

A etapa que antecede a quantificação das sulfonamidas é o preparo de amostra. Nesta etapa, existem diversos métodos convencionais que são utilizados para extração/pré-concentração do analito, sendo a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), as mais comuns. A LLE emprega solventes puros e

acessíveis, além de ser de simples execução. A problemática está na possibilidade de formação de emulsões, que faz com que a extração seja morosa, além de consumir grandes volumes de amostras e solventes, ocasionando problemas de descartes devido a toxicidade (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Na busca de procedimentos mais limpos e ambientalmente mais seguros, houve o desenvolvimento de extrações alternativas, como a assistida por ultrassom, assistida por micro-ondas e em ponto nuvem (CPE). O uso de tensoativos tem despertado interesse no meio científico, pois podem ser empregados nas etapas de concentração e/ou separação, evitando o uso de solvente orgânico e materiais onerosos como na LLE e SPE (MELNYK; NAMIEŚNIK; WOLSKA, 1993).

O procedimento de extração e pré-concentração em ponto nuvem pode ser aplicado em amostras orgânicas e inorgânicas através da formação de um ambiente organizado por agregados micelares podendo ser empregados em diversas matrizes, como por exemplo, amostras ambientais (água e solos).

Diante do exposto, o emprego da extração em ponto nuvem foi proposto para o desenvolvimento de um procedimento de preparo de amostra para pré concentração e separação de antimicrobianos como as sulfonamidas em amostras de leite bovino. A estratégia visou desenvolver um procedimento simples, rápido e que atendesse os requisitos da química verde.

1.1 Sulfonamidas

Agentes microbianos são definidos como substâncias que matam ou inibem o crescimento de microrganismos (FLOREZ-CUADRADO et al., 2018). Os antimicrobianos foram inseridos no mercado dos fármacos devido a eficácia na diminuição de infecções advindas de bactérias no início do século XX.

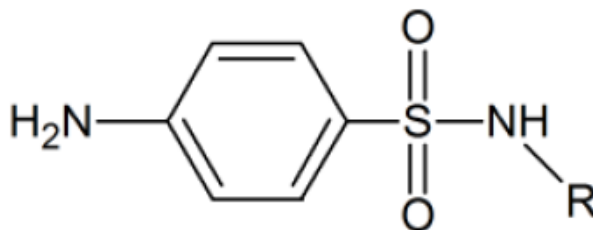
Em meados de 1930, um dos primeiros usos de sulfonamidas foi apresentado pelo patologista e microbiologista alemão Gerhard Domagk. Há relatos de que as sulfonamidas foram usadas durante a Segunda Guerra Mundial, sendo um dos pioneiros agentes microbianos e a partir disso, diversos outros antimicrobianos foram sintetizados (RIFKIND; FREEMAN, 2005).

As sulfonamidas são utilizadas em bovinos, aves e suínos. Em aves, são aplicadas para o tratamento de cólera aviária, *Salmonelose* e controle de infecções.

No entanto, diante da instrução normativa N° 51 de 19 de dezembro de 2019 (ANVISA), as sulfonamidas não podem ser mais administradas em animais produtores de ovos para consumo humano. Na suinocultura, são utilizadas em conjunto com a penicilina que promovem crescimento e ganho de peso, além de tratar infecções bacterianas. Um dos processos inflamatórios mais comuns em bovinos é a mastite, que se localiza na glândula mamária das vacas na fase de lactação e, nesta etapa, há mais incidência de aplicação de fármacos derivados das sulfonamidas.

O termo sulfonamida refere-se ao fármaco sintético derivado da substância *p*-aminobenzenosulfonamida e a estrutura básica contém um átomo de enxofre ligado ao nitrogênio, grupos amina e sulfonamida em posição *para* (Figura 1) (ALABURDA et al., 2007).

Figura 1 - Estrutura básica de uma sulfonamida

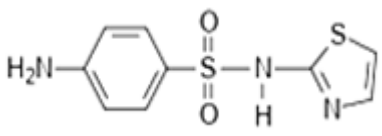
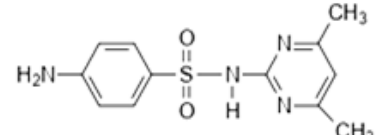
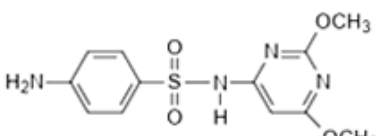


Fonte - Sukul e Spittleer (2006).

As sulfonamidas possuem características anfóteras, sendo o nitrogênio ligado ao anel benzênico protonado em meio ácido, pH entre 1 e 3 (pK_{a1}) e o nitrogênio que compõe o grupamento amida desprotonado entre pH 5 e 8 (pK_{a2}) e também são polares. As sulfonamidas tem tempo de meia vida longo, sendo resistentes a foto e termo degradações (REMKO; VON DER LIETH, 2004; SUKUL; SPITLLEER, 2006; BARAN et al., 2011), por isso, diante do processo de pasteurização do leite, não são totalmente eliminadas (SCHLEMPER; SACHET, 2017; ERBETTA, 2017).

O controle de resíduos de sulfonamidas em leite é estipulado pelas instruções normativas N° 76 e 77 de 26 de novembro de 2018 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e embasado pela quantidade total das sulfonamidas: sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sulfonamidas empregadas no controle de resíduos em leite

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

Fonte - Chemspider (2020).

O método oficial para determinação de resíduos de sulfonamidas em leite utiliza clorofórmio/acetona para o preparo de amostra, empregando a extração líquido-líquido, podendo ser seguida ou não de extração em fase sólida. A quantificação é realizada utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV ou fluorescência (FELTRIN et al., 2007).

1.2 Extração em Ponto Nuvem

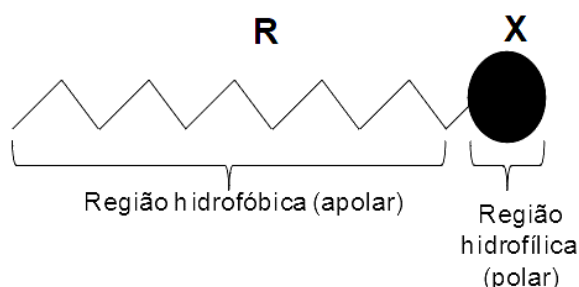
A metodologia mais utilizada no preparo de amostra é a extração líquido-líquido, também conhecida como extração por solventes que se baseia na partição do soluto entre duas fases imiscíveis, formando sistema heterogêneo (HWANGBO; ÖNER; SIN, 2019). Apesar de apresentar boa reprodutibilidade, possui algumas desvantagens, como demanda muito tempo e intenso trabalho laboratorial; propensão à formação de emulsão e uso de grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, expondo de forma insalubre o analista (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007).

A extração em ponto nuvem, do inglês *cloud point extraction*, é uma alternativa a LLE convencional. É baseada no uso de surfactantes que tem como propriedades a formação de sistemas micelares em soluções aquosas, a partir de uma determinada concentração, sendo reversível à medida que as condições iniciais da solução são

reestabelecidas. Neste procedimento, há menor requerimento de quantidade de amostra, não emprega solventes orgânicos e, conseqüentemente, reduz os resíduos gerados no laboratório, além de ser utilizada como etapa de extração e pré concentração do analito (XIE et al., 2010; LIU et al., 2010).

A palavra surfactante é derivada do termo em inglês *surface active agent*, onde substâncias compostas por moléculas orgânicas (monômeros de surfactante) tem como propriedade diminuir a tensão superficial do meio em que estão dissolvidos e, por isso, denominadas tensoativos. Os surfactantes apresentam estrutura composta por R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarbonetos e X é um grupo polar (Figura 2).

Figura 2 - Esquema da estrutura de um monômero de surfactante

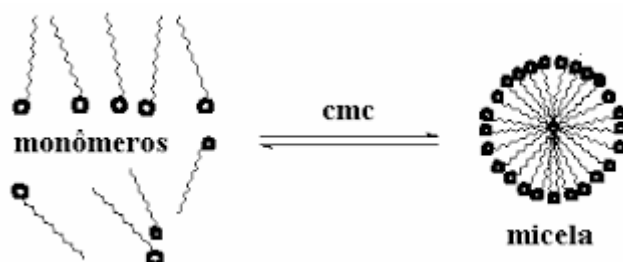


Fonte - Adaptado de Bezerra e Ferreira (2006).

Em soluções aquosas, a partir de uma determinada concentração denominada concentração micelar crítica (CMC), ocorre a associação dos monômeros de surfactante formando micelas, cujas estruturas dependem geometricamente das moléculas do surfactante. As micelas formam agregados em sistemas coloidais, transparentes, apresentam formas variadas (esférica ou elipse) e fáceis de se reproduzir, mas podem ser destruídas quando há grandes volumes de água na solução, abaixando a concentração do surfactante (BEZERRA; FERREIRA, 2006).

Abaixo da CMC, os surfactantes estão na forma de monômeros não associados, onde ficam dispersos na solução e adsorvidos na interface, Figura 3. Os surfactantes são classificados a partir do grupo hidrofílico em não-iônicos, catiônicos, aniônicos e anfóteros quando ambas cargas estão presentes, conforme Tabela 2 (RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009).

Figura 3 - Equilíbrio dinâmico entre monômeros de surfactante e micela



Fonte - Adaptado de Yuniarti (2007).

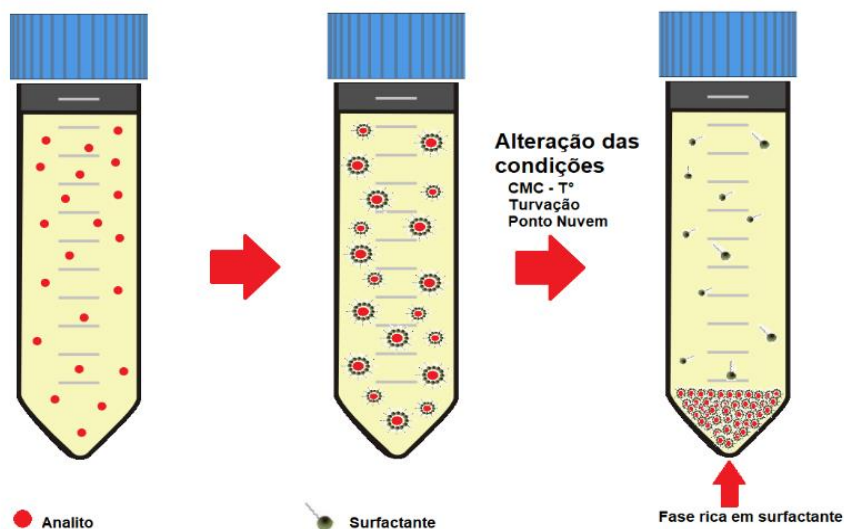
Tabela 2 - Classificação de surfactantes conforme grupo hidrofílico

Classificação	Surfactante
Catiônicos	Brometo de cetiltrimetil amônio
	Brometo de dodeciltrimetil amônio
	Cloreto de cetilpiridino
Aniônicos	Dodecil sulfato de sódio
	Bis(2-etilhexil) sulfossuccinato de sódio
Não-iônicos	Fosfato de dihexadecil
	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol
	Polioxietileno (7-8) t-octil fenol
Anfóteros	Polioxietileno (23) dodecacol
	3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato
	4-(dodecildimetil amônio) butirato

Fonte - Silva (2008).

O fenômeno denominado ponto nuvem ocorre em solução que contém surfactante não-iônico em uma determinada temperatura e em quantidades acima da CMC. Monômeros de surfactante se agregam tornando a solução turva e ocorrendo a separação de duas fases isotrópicas, fase aquosa (pobre em surfactante) e fase rica em surfactante (concentrada em surfactante), ilustrado na Figura 4 (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

Figura 4 - Procedimento da extração em ponto nuvem

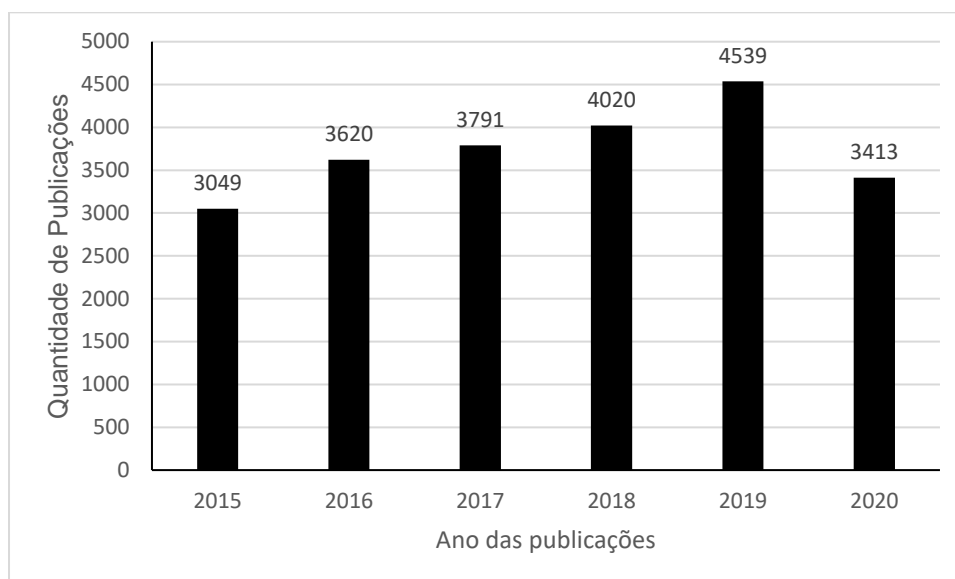


Fonte - Autor.

Em 1970, Saito e Shinoda utilizaram o procedimento de extração em ponto nuvem para separação de compostos orgânicos e, em 1978, Watanabe e Tanaka utilizaram o procedimento para extração de íons metálicos em amostras de água, o que despertou interesse de novas pesquisas (WATANABE; TANAKA, 1978).

O crescimento gradativo e progressivo do número de pesquisas ao longo dos anos (conforme Science Direct, Figura 5) empregando o procedimento em ponto nuvem para extração de analitos orgânicos e inorgânicos (ZHANG; DUAN, WANG, 2011; MADEJ, 2009) ocorreu devido a simplicidade, eficiência de extração e preocupação em utilizar um procedimento limpo.

Figura 5 - Artigos indexados no Science Direct com o termo “cloud point extraction” - extração em ponto nuvem



Fonte - Science Direct (2021).

Alguns fatores podem afetar a eficiência da extração e devem ser considerados no emprego do procedimento em ponto nuvem, como pH, concentração de surfactante, força iônica, tempo de incubação, temperatura e centrifugação (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005). Um dos surfactantes mais utilizados para a etapa de CPE é o Triton X-114 devido a temperatura de ponto nuvem estar entre 23 e 25 °C, apresentar CMC entre 0,20 e 0,35 mmol L⁻¹ e possuir baixo custo, além de ser biodegradável (NASCIMENTO; ROCHA; ROCHA, 2015).

1.3 Determinação de sulfonamidas por extração em ponto nuvem

A utilização da extração em ponto nuvem permite a obtenção de elevados fatores de pré-concentração, permitindo determinações em baixos níveis de concentrações.

Yu et al. (2013) propuseram método de extração em ponto nuvem assistido por ultrassom para determinação de duas sulfonamidas (sulfadiazina e sulfamerazina) em amostras de mel. A metodologia foi baseada na derivatização das sulfonamidas com fluorescamina, produzindo complexos fluorescentes que foram extraídos para a fase rica de surfactante com posterior quantificação por fluorescência. Foram otimizados

parâmetros como a concentração de fluorescamina, pH, temperatura e tempo e estimadas as características analíticas, como os limites de detecção (LD) na ordem de 0,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para sulfadiazina e sulfamerazina, respectivamente. O uso do ultrassom com a extração em ponto nuvem permitiu a redução do tempo de derivatização, conseqüentemente diminuindo o tempo de análise, além de melhorar significativamente as recuperações. Os desvios padrão relativos e recuperações foram estimados, respectivamente, em 4,1 e 92,2%, demonstrando a viabilidade da CPE de sulfonamidas em mel.

Nong et al. (2017) empregou dupla extração em ponto nuvem para determinação simultânea de sulfonamidas em amostras de água e urina em HPLC. No primeiro PN, as sulfonamidas foram extraídas e pré-concentradas na fase rica em surfactante e no segundo PN com adição de NaOH, ficaram na fase aquosa que foi filtrada e injetada no HPLC. Os limites de detecção foram estimados na ordem de micrograma por litro ($<6,2 \mu\text{g L}^{-1}$). Recuperações foram alcançadas entre 85 e 108% com desvios padrão relativos ($n = 6$) entre 1,5 e 7,7%.

Li et al. (2020) conduziram estudo em que o procedimento de extração em ponto nuvem por *salting out* juntamente com UHPLC-MS-MS foi utilizado para extração e quantificação de onze sulfonamidas no leite. Nas amostras de leite foram adicionados Triton X-114, agitados por 10 minutos, seguido da adição de ácido acético e solução saturada de sulfato de sódio, promovendo o efeito *salting out* com desnaturação das proteínas do leite. Posteriormente, foram empregados dois procedimentos de extração em ponto nuvem subsequentes, finalizando com extração com acetonitrila e quantificação em UHPLC-MS-MS. Resposta linear foi observada entre 0,05 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficiente de correlação de 0,997, limite de quantificação menor que 0,06 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e recuperações estimadas entre 61 a 92%. No entanto, o procedimento requereu diversas etapas, sendo laborioso e moroso e emprega equipamento com alto custo.

1.4 Medidas Digitais

As cores estão ligadas ao sistema visual humano, sendo uma das primeiras habilidades desenvolvidas na percepção das imagens, que é o produto da interação que ocorre entre luz e matéria. A percepção das cores também se torna ferramenta

de comunicação, transmitindo ao indivíduo determinadas informações que são importantes para atividades cotidianas. Outro impacto da análise das percepções das cores está no campo da ciência, onde a partir da observação das reações colorimétricas foi possível obter resultados qualitativos (FERNANDES et al., 2020).

Um desafio para realizar as análises advindas de reações colorimétricas foi simular a visão humana em aparelhos que captam a luz e imagens, estes contam com sensores que fazem a conversão da energia do fóton em energia elétrica. As respostas destas conversões foram alinhadas em planos cartesianos compostos por pixels, que podem indicar alteração de luminosidade, através da reflexão da luz, permitindo obter informações qualitativas e quantitativas (SANTOS; PEREIRA-FILHO, 2013; FERNANDES et al., 2020).

Cada pixel adquire transmitância diferente proveniente dos canais vermelho, verde e azul (sistema RGB), onde o sinal é convertido em unidades decimais entre 0 e 255 (aditivo de cores) e alinhados em camadas que podem ser interpretadas por *softwares* e aplicativos de acesso livre. O uso das medidas digitais possibilita a obtenção de resultados para as análises de monitoramento da cor, qualidade e segurança dos alimentos. Além disso, as medidas digitais utilizando *smartphones* para fins analíticos tem maior facilidade de acesso, pois é um aparato amplamente utilizado, além de ser portátil (PASSARETTI FILHO, 2015).

Fulgêncio et al. (2020) propuseram o desenvolvimento de um método de calibração multivariado empregando imagens digitais para controle de qualidade de cervejas, baseado em valores de coloração obtidos pelo método padrão de referência (SRM). *Smartphone* foi utilizado para obtenção dos histogramas empregados na construção dos modelos de mínimos quadrados parciais (PLS). As amostras foram degaseificadas em aparelho ultrassônico, adicionadas gotas de 1-octanol como agente antiespumante e, posteriormente transferidas para placas de petri encaixadas em câmara escura para aquisição das imagens. Diferentes amostras foram analisadas dentro do intervalo de 3 a 130 unidades SRM, possibilitando construir o modelo de PLS em duas faixas lineares (acima e abaixo 12 unidades SRM). Como não houve necessidade da realização de pré-tratamento das amostras, a metodologia foi considerada fácil, rápida e de simples aplicação.

Silva e Rocha (2020) desenvolveram trabalho para detecção de adulterantes no leite por meio da aquisição de imagens digitais por *smartphone*. A metodologia consistiu no emprego da precipitação das proteínas do leite através do efeito *salting out* com sulfato de cobre. O íon cobre remanescente no soro de leite foi complexado com o ácido etilenodiaminotetracético. O complexo tem coloração azulada, sendo inversamente proporcional ao conteúdo das proteínas, foi monitorado utilizando imagens digitais. Coeficiente de variação foi estimado em 3,0% ($n = 20$) e 32 determinações foram realizadas por hora, além de detectar até 1,0% (v/v) de água em leite adulterado com nível de confiança de 95%.

Costa et al. (2020) empregaram imagens digitais para monitoramento da reação iodométrica na determinação de adulterantes, como amido, H_2O_2 e $NaClO$ em leite. O aplicativo empregado para aquisição das imagens digitais foi o PhotoMetrix®, baseado na regressão por PLS dos histogramas de RGB. Os histogramas da imagem foram obtidos automaticamente usando a câmera do *smartphone* e processados dentro do aplicativo. Coeficiente de correlação foi estimado em 0,993, demonstrando a viabilidade do método. Além de ser considerado rápido, de baixo custo e portátil para quantificação de adulterantes em leite.

Diante do exposto, o emprego da extração em ponto nuvem e detecção por imagens digitais é relevante no desenvolvimento de procedimentos alternativos rápidos, práticos e de baixo custo, atendendo os princípios da química analítica verde.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos e acessórios

As medidas digitais foram baseadas em refletância utilizando a câmera e um aplicativo de *smartphone* para capturar as imagens e converter em valores de RGB.

A câmara de medida foi construída utilizando uma caixa de isopor com 14, 16 e 10 cm de altura, largura e profundidade, respectivamente, Figura 6. As aberturas para a entrada de tubos tipo Falcon® de 15 mL e para adequar à câmera e a lanterna do *smartphone* (Azus_X00ADA, Android versão 6.0.1, câmera de 16 MP) foram feitas na parte superior e frontal da caixa. Os tubos foram posicionados de forma que as leituras fossem realizadas em ângulo perpendicular, assegurando medição sempre no mesmo ponto. O aplicativo empregado nas medidas RGB foi o Color Grab (versão 3.6.1, Loomatix ©), disponível gratuitamente na Play Store para Android. O controle da iluminação foi realizado utilizando lâmpada de LED de saída de emergência (Elgin, 2 W) localizada na parte inferior da câmara de medida e lanterna do celular, que pode ser utilizada de forma simultânea pelo aplicativo.

Figura 6 - Câmara empregada nas medidas RGB, visão (a) superior com abertura para tubo; (b) frontal e lateral e (c) interior pela câmera do *smartphone*



Fonte - Autor.

Banho Dubnoff (QUIMIS, modelo 0226M1) e centrífuga (QUIMIS, modelo Q222T) foram utilizados no processo de aquecimento e separação das fases, respectivamente. Vórtex (SCIENTIFIC INDUSTRIES, modelo SI-0266 Vórtex-Genie 2) e mesa agitadora (QUIMIS, modelo Q225M) foram empregados no *clean-up* da amostra.

Espectrofotômetro UV-Vis (AGILENT, modelo Cary 60) equipado com cubeta de acrílico de volume reduzido de 1 cm de caminho óptico foi empregado para as medidas espectrofotométricas. O *software* Cary WinUVvis foi utilizado para aquisição de dados.

2.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada (18,2 M Ω cm a 25 °C).

As soluções de referência de sulfonamidas totais contendo sulfametazina (SMZ), sulfametodoxina (SDM) e sulfatiazol (STZ) (Merck, Alemanha) foram preparadas por diluição em água deionizada das soluções estoque de 10 mg L⁻¹ de cada sulfonamida.

Solução de Triton X-114 (Sigma, Alemanha) 7% (m/v) foi preparada em água e mantida sob refrigeração em temperatura inferior a 20 °C.

A solução reagente de *p*-DAC (*p*-dimetilaminocinamaldeído) 0,3 mmol L⁻¹ contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,02 mol L⁻¹ foi preparada por dissolução de quantidades apropriadas dos reagentes em HCl 0,3 mol L⁻¹. Solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol L⁻¹ foi preparada pela dissolução em água deionizada.

Soluções das espécies Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, PO₄³⁻, SO₄²⁻, Cl⁻ foram preparadas a partir do sal apropriado dissolvido em leite.

As amostras de leite foram adquiridas no comércio local da cidade de Piracicaba - SP e fortificadas para a realização do procedimento proposto.

2.3 Procedimento Experimental

Para o procedimento de *clean-up* da amostra, 1,5 mL da amostra fortificada ou soluções de referência contendo as sulfonamidas totais 50 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,0 mL de ácido tricloroacético (0,3 mol L^{-1}) foram adicionados em tubo tipo Falcon®. Os tubos foram agitados por 5 min em mesa agitadora e centrifugados a 4000 rpm também por 5 min. O sobrenadante foi retirado para posterior extração por ponto nuvem.

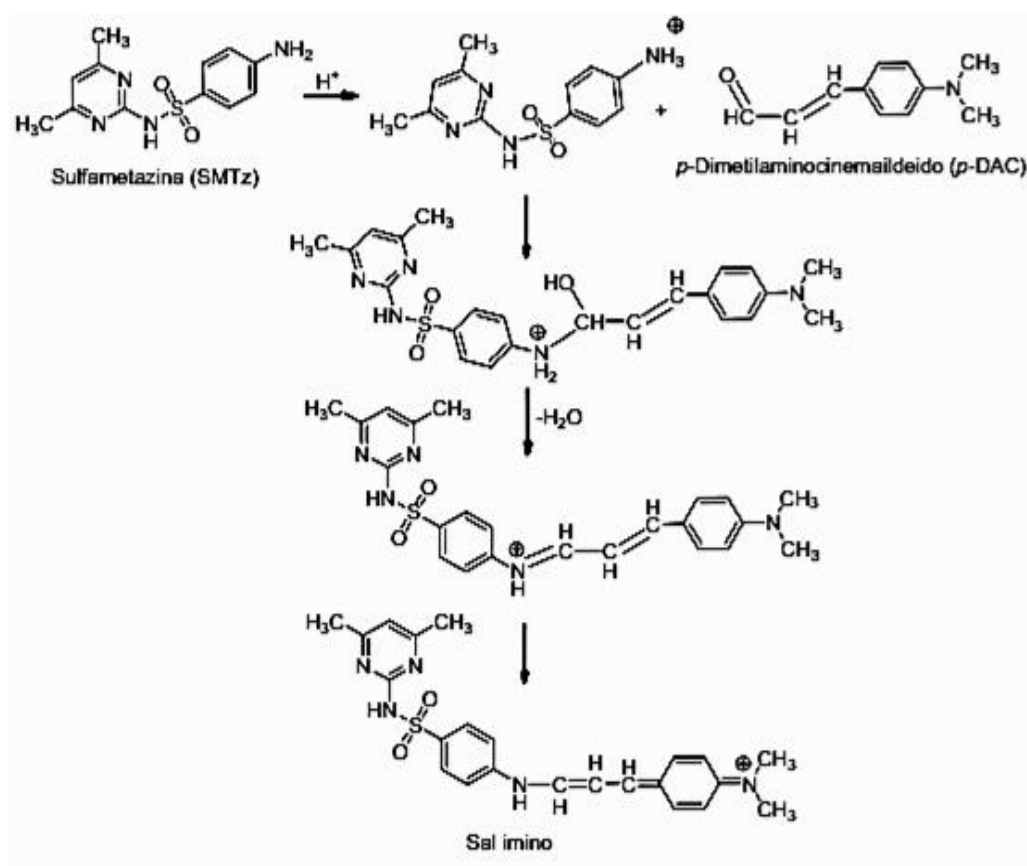
Para o procedimento de extração em ponto nuvem, alíquotas de 2 mL da amostra límpida contendo as sulfonamidas totais, 2 mL da solução reagente (0,3 mmol L^{-1} de *p*-DAC; 0,3 mol L^{-1} de HCl e 0,02 mol L^{-1} SDS) e 1 mL de Triton X-114 7% (m/v) foram adicionadas em tubos de 15 mL tipo Falcon®, aquecidas em banho maria a 40 °C por 10 minutos e centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, as medidas analíticas por imagens digitais foram realizadas diretamente nos tubos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

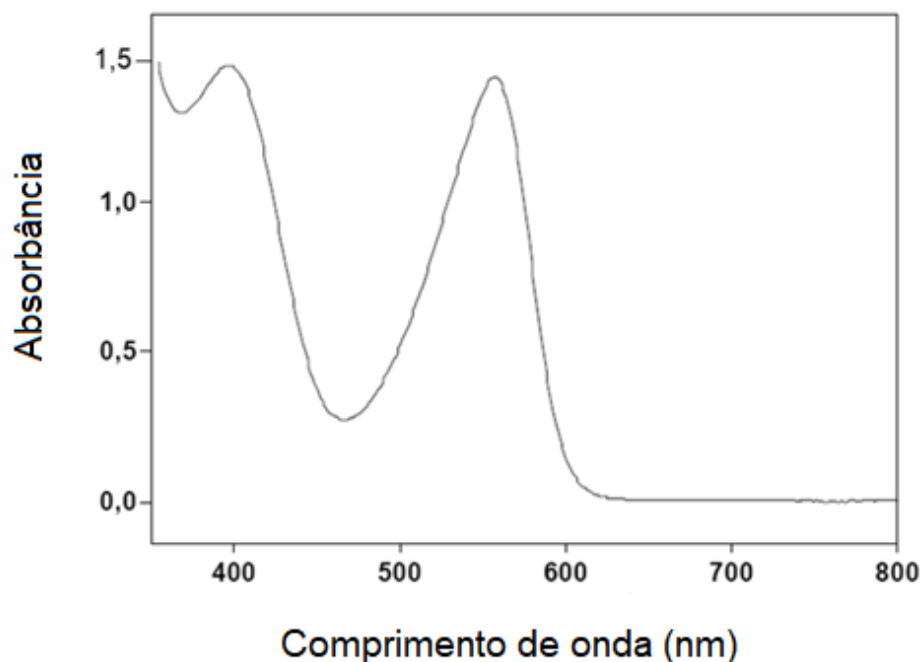
O procedimento foi proposto em virtude da baixa concentração de sulfonamidas em leite bovino, a simplicidade da extração em ponto nuvem e da determinação por imagens digitais.

A determinação colorimétrica de sulfonamida foi baseada na reação de condensação da amina secundária com o grupo carbonil do *p*-dimetilaminocinamaldeído em meio ácido (Figura 7), formando o sal imino de cor rosa com máximo de absorção em 557 nm (Figura 8).

Figura 7 - Esquema do mecanismo da reação entre *p*-DAC e sulfametazina em meio ácido



Fonte - Fernandes (2011).

Figura 8 - Espectro de absorção do sal imino formado entre a sulfonamida e o *p*-DAC

Fonte - Autor.

As leituras foram realizadas por imagem digital no canal G do sistema RGB, descontando o valor do branco (255).

3.1 Otimização do procedimento experimental

O leite possui na composição proteínas e gorduras que interferem nas reações químicas, sendo necessário realizar etapas de pré-tratamento da amostra para obtenção de extratos limpos. Para este fim, usa-se solventes orgânicos, como acetonitrila, clorofórmio ou acetona. Uma alternativa ao uso de solventes orgânicos é o emprego de ácido tricloroacético, ácido fraco e eficiente na desnaturação das proteínas do leite (FENG et al., 2012).

Nesse trabalho, o *clean-up* da amostra foi realizado com a adição de TCA que após agitação e centrifugação, as sulfonamidas ficaram dispersas no soro do leite e as proteínas e gorduras separadas na fase inferior.

As otimizações foram realizadas pelo método univariado e em triplicata. A concentração de TCA foi avaliada entre 0,3 e 1,0 mol L⁻¹ com volume de 3,0 mL em

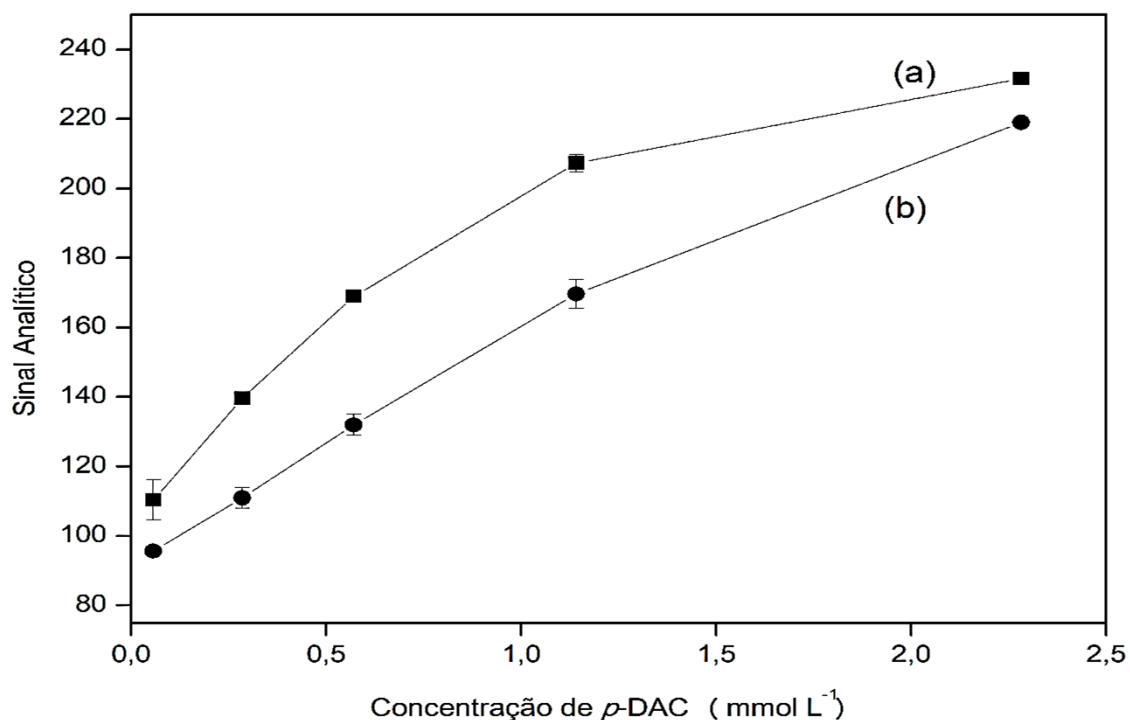
1,5 mL de amostra de leite fortificada entre 0,05 e 0,2 mg L⁻¹ de sulfonamidas totais. Ensaio de adição e recuperação foram realizados e as maiores recuperações foram estimadas em 100 ± 0,5% quando 0,3 mol L⁻¹ de TCA foi empregado. Nessa concentração de ácido, o volume de TCA foi avaliado entre 2 e 4 mL com 2 mL de amostra e as melhores recuperações 93 ± 0,5% foram obtidas com emprego de 3 mL de TCA. Em concentrações e volumes menores que os selecionados, a precipitação das proteínas foi prejudicada, resultando em soluções turvas, dificultando as medidas por imagens digitais.

A etapa de agitação foi avaliada através do emprego de vórtex ou mesa agitadora com movimentos orbitais simultaneamente com os tempos de agitação e centrifugação (4000 rpm), variando entre 5 e 20 minutos cada um, visando empregar os menores tempos que resultassem na extração completa do analito. Ensaio de adição e recuperação foram realizados em amostra de leite fortificada com 100 µg L⁻¹ de sulfonamidas totais. Para agitação empregando aparelho vórtex, as recuperações de sulfonamidas totais foram estimadas entre 100 e 283%, valores altos devido a turvação do soro do leite em razão do vigor da agitação, demonstrando interferências ocasionadas pela matriz da amostra. Recuperações próximas de 100% foram alcançadas com movimentos menos vigorosos e por menor tempo de agitação e centrifugação. Os estudos subsequentes foram realizados com agitação das amostras com mesa com movimento orbital e tempos de agitação e centrifugação por 5 minutos cada.

Os efeitos dos parâmetros que afetam o desenvolvimento da reação (concentrações dos reagentes *p*-DAC, HCl e SDS) e da extração do analito do soro do leite (concentração de surfactante, temperatura e tempo de incubação) foram investigados com a finalidade de obter maior eficiência, utilizando menor volume de reagente, gerando menor quantidade de resíduos e reduzindo o tempo de análise. A concentração do reagente *p*-DAC foi o primeiro parâmetro otimizado, considerando o efeito sobre o sinal analítico na determinação das sulfonamidas totais (STZ, SMZ e SDM). A avaliação foi conduzida com sulfonamidas totais 100 µg L⁻¹, SDS 0,02 mol L⁻¹, HCl 0,3 mol L⁻¹ e Triton X-114 7% (m/v).

A concentração de *p*-DAC foi avaliada entre 0,0057 e 2,3 mmol L⁻¹, sendo as soluções do padrão e do branco analítico submetidas ao procedimento de extração em ponto nuvem. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Efeito da concentração de *p*-DAC sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e Triton X-114 7% (m/v)

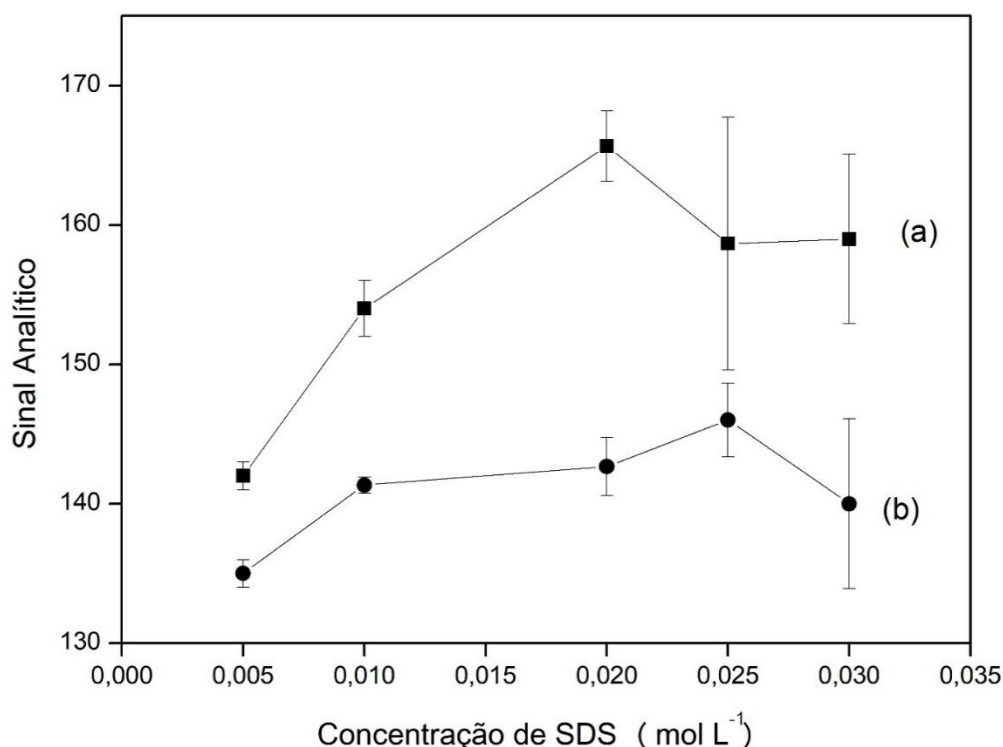


Fonte - Autor.

Na Figura 9, pode ser observado que o sinal analítico aumentou até $2,3 \text{ mmol L}^{-1}$ *p*-DAC como também ocorreu aumento do sinal do branco devido a coloração do reagente. A maior diferença entre o branco e o sinal analítico foi observada na concentração de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ *p*-DAC que foi selecionada para os estudos subsequentes.

Surfactantes podem diminuir a tensão superficial ou influenciar na superfície de contato entre dois líquidos. O uso em meio reacional pode favorecer a sensibilidade analítica, aumentando a absorvidade molar da substância de interesse. O efeito do surfactante dodecil sulfato de sódio foi avaliado nas concentrações entre $0,005$ a $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ sobre o sinal analítico (Figura 10). O estudo foi realizado com sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$, *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e Triton X-114 7% (m/v).

Figura 10 - Efeito da concentração de SDS sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e Triton X-114 7% (m/v)



Fonte - Autor.

Aumento no sinal analítico foi observado em 78% quando foi utilizado $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em comparação com $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ de SDS, sem afetar significativamente o sinal do branco analítico, conforme Figura 10. Acima da concentração de SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, os sinais analíticos foram menores e os desvios padrão foram prejudicados devido a turbidez da solução. Isto pode ter ocorrido, pois a mistura de surfactantes não-iônicos e iônicos aumenta a temperatura de ponto nuvem. Por exemplo, a adição de SDS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ aumentou a temperatura de ponto de nuvem, utilizando solução de Triton X-114 1% (m/v) de 25 para 74°C , tornando difícil a separação das fases (GU; GALERA-GÓMEZ, 1995). Devido a este aspecto, as quantificações foram realizadas com adição de SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$.

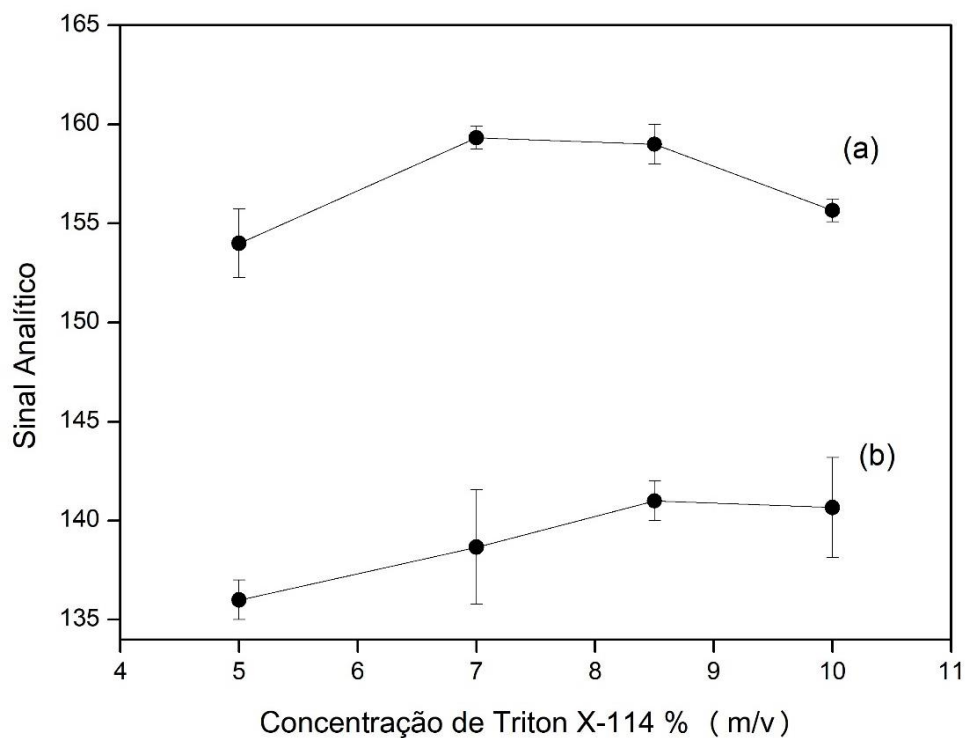
Em geral, as sulfonamidas estão totalmente protonadas em pH abaixo de 2,0 devido aos pK_{a1} e pK_{a2} apresentarem valores em torno de 2,1 e 7,0, respectivamente (ŞANLI et al., 2010). Esta condição é ideal para favorecer a reação de derivatização, formando o sal imino e também que favorece a separação de fases na extração em ponto nuvem, diminuindo a repulsão dos monômeros (BEZERRA; FERREIRA, 2006).

O estudo da acidez do meio foi realizado com sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$, *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e Triton X-114 7% (m/v) e as concentrações avaliadas de HCl foram $0,1$ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para os estudos subsequentes, pois apresentou maior diferença do sinal analítico e do branco, além do pH do meio reacional se encontrar em torno de 1,0.

A concentração do surfactante pode afetar tanto a eficiência de extração, quanto a razão entre os volumes das fases. O surfactante Triton X-114 foi selecionado para a extração do produto da reação devido ao ponto nuvem ocorrer em temperatura entre 23 a 25°C e da alta densidade, que facilita a separação das fases por centrifugação (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

As concentrações avaliadas de Triton X-114 foram de 5 a 10% m/v (Figura 11) e o estudo foi realizado com sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$, *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 11 - Efeito da concentração de Triton X-114 (m/v) sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$

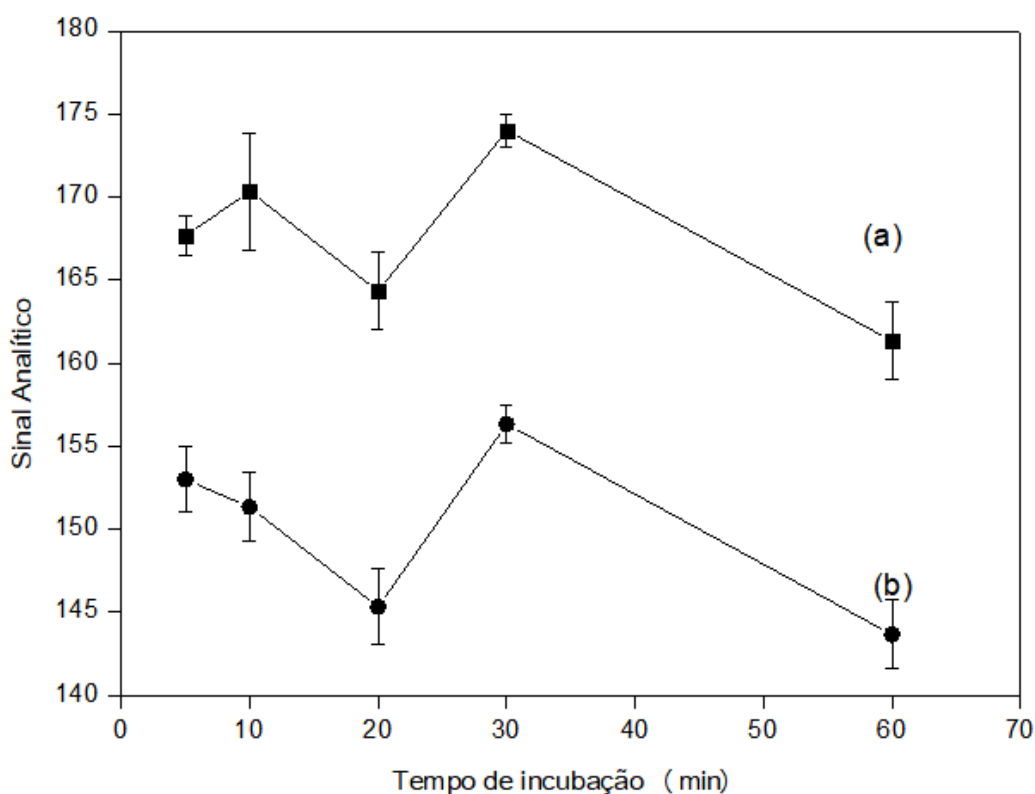


Fonte - Autor.

Na Figura 11 pode ser observado que para concentrações de Triton X-114 até 7% (m/v), os sinais analítico e do branco aumentaram. Acima desta concentração, com o aumento do volume da fase rica, os sinais do analito foram afetados. A concentração de Triton X-114 7% (m/v), escolhida para extração, é 370 vezes maior que a CMC ($0,35 \text{ mmol L}^{-1}$) e produz $500 \mu\text{L}$ de fase rica em surfactante.

O efeito do tempo de incubação em banho de água com temperatura de 40°C (de 5 a 60 minutos) foi avaliado, Figura 12, visando empregar os menores tempos que resultassem na extração completa do sal imino e eficiente separação de fases. Este estudo foi realizado com sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$, *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e Triton X-114 7% (m/v).

Figura 12 - Efeito do tempo de incubação sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e Triton X-114 7% (m/v)

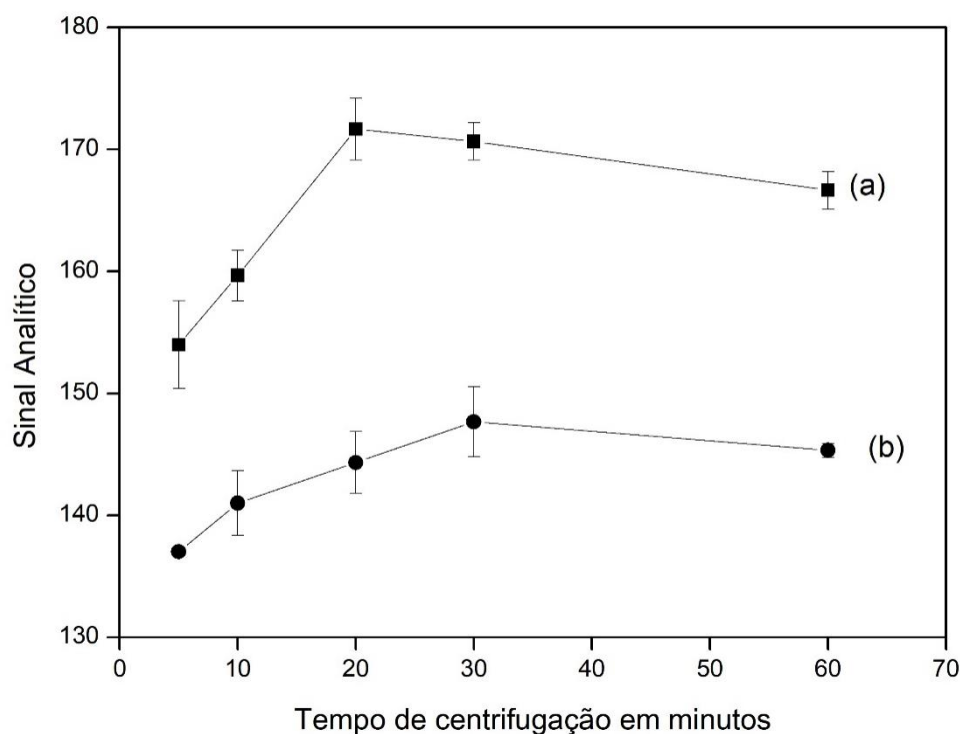


Fonte - Autor.

Conforme Figura 12, não houve diferenças significativas entre os sinais analítico e do branco ao variar o tempo de incubação em banho de água. Então, para garantir a formação do PN foi selecionado o tempo de 20 minutos.

No procedimento de extração em ponto nuvem, a centrifugação acelera a separação de fases e o tempo de centrifugação foi avaliado na faixa de 5 a 20 minutos (Figura 13) com com sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$, *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, Triton X-114 7% (m/v) e tempo de incubação de 20 min.

Figura 13 - Efeito do tempo de centrifugação sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, Triton X-114 7% (m/v) e tempo de incubação de 20 min

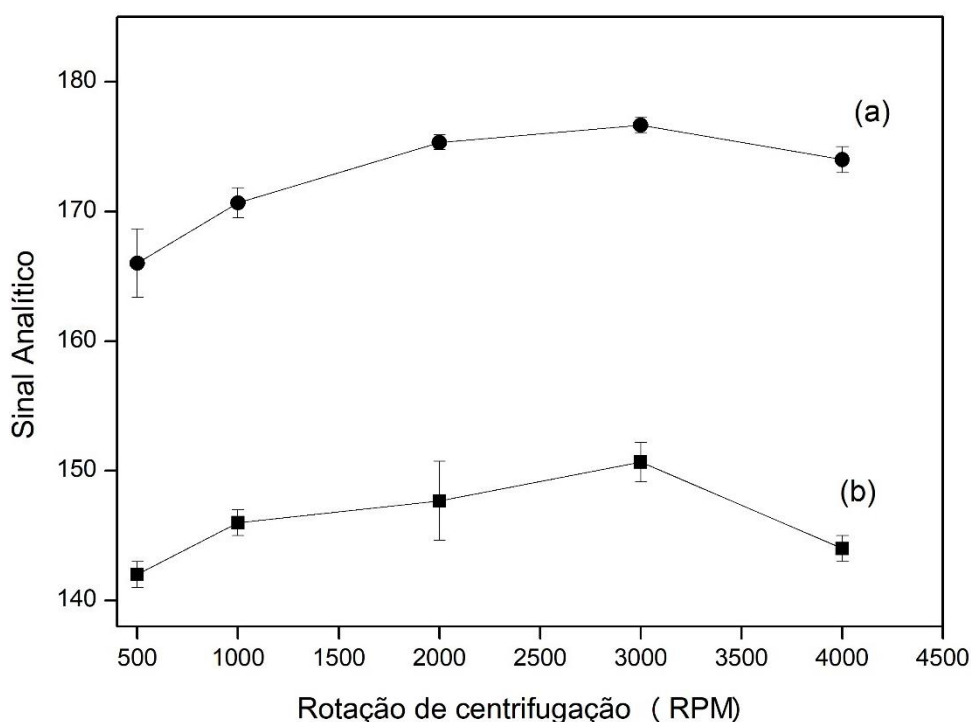


Fonte - Autor.

Na Figura 13 pode ser observado que o sinal analítico aumentou até 20 minutos, demonstrando a efetiva separação das fases. Acima desse tempo, provavelmente, houve degradação do reagente cromogênico, afetando os sinais analíticos. Para os estudos subsequentes, foi selecionado o tempo de 20 minutos.

Outro fator avaliado na centrifugação foi a rotação por minutos entre 500 e 4000 (Figura 14), afim de favorecer a separação entre as fases e garantir maior eficiência no procedimento em ponto nuvem.

Figura 14 - Efeito do tempo de centrifugação sobre o sinal analítico de sulfonamidas totais $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b). Condições experimentais: *p*-DAC $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, Triton X-114 7% (m/v) e tempo de incubação e centrifugação de 20 min



Fonte - Autor.

De acordo com a Figura 14, a maior diferença observada entre os sinais analítico e do branco foi com 4000 rpm que favoreceu a separação entre as fases.

Na Tabela 3 são apresentados os parâmetros químicos e físicos, as faixas avaliadas, bem como os valores selecionados na otimização experimental.

Tabela 3 - Parâmetros otimizados da EPN e imagens digitais para determinação de sulfonamidas totais em leite bovino

Parâmetro	Faixa Estudada	Valor Selecionado
p-DAC (mmol L ⁻¹)	0,0057 - 2,3	0,3
SDS (mol L ⁻¹)	0,005 - 0,03	0,02
HCl (mol L ⁻¹)	0,1 - 0,5	0,3
Triton X-114 (% m/v)	5 - 10	7
Tempo de incubação (min)	5 - 60	20
Tempo de centrifugação (min)	5 - 60	20
Rotação (rpm)	500 - 4000	4000

Fonte - Autor.

3.2 Avaliação das características analíticas

As características analíticas foram estimadas após otimizações dos parâmetros experimentais. O limite de detecção e quantificação foi estimado a partir da resposta da menor quantidade do analito diferente do branco analítico. O coeficiente de variação foi estimado com 11 medidas de 0,4 mg L⁻¹ de sulfonamidas totais e a frequência de análises foi estimada calculando o tempo total do preparo de amostra e quantificação do analito.

Foi observada a resposta linear entre 0,01 e 0,4 mg L⁻¹ de sulfonamidas totais, descrita pela equação Sinal analítico = 2,50 + 0,0514 C (µg L⁻¹), R = 0,999. O limite de detecção e quantificação, o coeficiente de variação e a frequência de análises foram estimados em 0,01 mg L⁻¹, 1,3% e 32 determinações por hora, respectivamente. Na Tabela 4 são apresentadas as características analíticas obtidas do procedimento desenvolvido.

Tabela 4 - Características analíticas da EPN e imagens digitais para determinação de sulfonamidas totais em leite bovino

Características analíticas	
Resposta linear (mg L ⁻¹)	0,01 – 0,4
Limite de detecção e quantificação (mg L ⁻¹)	0,01
Coeficiente de variação (%; n=11)	1,3
Frequência de análises (h ⁻¹)	32

Fonte - Autor.

O fator de enriquecimento foi calculado pela razão das inclinações das curvas analíticas obtidas com e sem pré-concentração para volumes iniciais e finais de 5,0 e 0,5 mL, respectivamente. As equações das retas obtidas foram Sinal analítico = $2,50 + 0,0514 C$ ($\mu\text{g L}^{-1}$), $R = 0,999$ e Sinal analítico = $2,58 + 0,0193 C$ ($\mu\text{g L}^{-1}$), $R = 0,938$ com e sem PN, respectivamente. O fator de enriquecimento estimado foi de 3, abaixo do esperado (10,0), acredita-se que um dos problemas seja a fácil degradação do sal imino.

As características analíticas do procedimento proposto foram comparáveis as obtidas em outros procedimentos baseados em PN (Tabela 5).

Recuperações aceitáveis são apresentadas para todos os procedimentos listados e o menor coeficiente de variação (1,3%) foi estimado para o procedimento desenvolvido, o que foi alcançado devido as medidas realizadas diretamente no tubo por imagens digitais.

Outra vantagem do procedimento desenvolvido é o baixo consumo de reagentes analíticos devido a miniaturização da EPN e medidas analíticas realizadas diretamente no tubo. Além disso, como foi evitada a retirada da fase pobre em surfactante e, por consequência, a diluição comumente realizada antes da quantificação analítica, também houve redução na geração de resíduos. Equipamentos caros e sofisticados não foram empregados, bem como solventes puros e tóxicos.

Tabela 5 - Características analíticas de procedimentos com EPN para determinação de sulfonamidas.

Amostra	Técnica analítica	Recuperação (%)	CV (%)	Referência
Leite	Espectrofotometria	80 - 120	4,0	(HAJIAN et al., 2013)
Mel	Fluorescência	84 - 92	3,7	(YU et al., 2013)
Urina e Água	HPLC – UV	85 - 108	7,7	(NONG et al., 2017)
Leite	Espectrofotometria	95 - 98	4,7	(KAZEMI et al., 2017)
Leite	Imagem Digital	64 - 125	1,3	Este trabalho

Fonte - Autor.

3.3 Efeito de espécies concomitantes

O efeito de alguns íons que podem ser encontrados em amostras de leite foi avaliado empregando solução de 100 µg L⁻¹ de sulfonamidas totais e concomitantes em concentrações elevadas (1000 vezes maiores que o analito).

Os sinais referentes as sulfonamidas totais foram obtidos na ausência e presença de íons Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺, Cl⁻, SO₄²⁻ e PO₄³⁻, sendo considerado não interferente em variação de sinal analítico menor que 5%.

Nenhuma espécie estudada foi considerada interferente no ensaio de ação e recuperação empregado pelo procedimento desenvolvido.

3.4 Análise de amostras de leite bovino

Ensaio de adição e recuperação foram realizados em amostras de leite dos tipos desnatado, semidesnatado, integral UHT, pasteurizado tipo A e integral em pó. As amostras foram fortificadas (n=3) com concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 mg L⁻¹ de sulfonamidas totais, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Ensaio de adição e recuperação de sulfonamidas totais em amostras de leite bovino.

Sulfonamidas totais (mg L⁻¹)	Desnatado	Semi Desnatado	Integral UHT	Pasteurizado tipo A	Integral em pó
	Recuperação (%)				
0,05	85 ± 13	100 ± 17	125 ± 19	113 ± 22	88 ± 22
0,1	87 ± 15	70 ± 8	117 ± 9	100 ± 15	94 ± 4
0,2	90 ± 4	64 ± 8	100 ± 1	74 ± 14	106 ± 6

Fonte - Autor.

Conforme os órgãos de regulamentação internacionais (FDA e AOAC), os valores aceitos para ensaios de recuperação para resíduos em amostras complexas estão na faixa entre 60 e 115% (US FDA, 2019). Nos resultados apresentados na Tabela 6, com exceção de uma das amostras de leite que apresentou recuperação de 125%, todas as outras estão dentro da faixa aceitável, demonstrando a potencialidade do procedimento desenvolvido.

4 CONCLUSÕES

O procedimento de extração e pré concentração em ponto nuvem desenvolvido mostrou ser uma alternativa simples, rápida e robusta para determinação de sulfonamidas totais em amostras de leite bovino. Foi obtida elevada frequência de análises com reduzido consumo de reagente e baixa geração de resíduos. Além de eliminar o uso de solventes orgânicos.

Limites estabelecidos por agência regulamentadora (ANVISA) de resíduos de sulfonamidas totais em leite foram alcançados com o emprego de imagens digitais.

O procedimento desenvolvido apresentou tolerância aos íons em concentrações superiores as que podem ser encontradas em amostras de leite bovino, não causando interferência significativa. Estudos de adição e recuperação apresentaram recuperações aceitáveis dentro dos estipulados por órgãos governamentais.

REFERÊNCIAS

AGOSTONI, C.; TURCK, D. Is cow's milk harmful to a child's health? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 53, n. 6, p. 594–600, 2011.

ALABURDA, J. et al. Sulfonamides in milk by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1587–1592, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal – PAMVET - Relatório 2006-2007 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades)**. Brasília, DF, 2009. 76 p.

BANGERT, M.K.; HASBUN, R. Neurological and Psychiatric Adverse Effects of Antimicrobials. **CNS Drugs**, v. 33, n. 8, p. 727–753, 2019.

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, 2011.

BEZERRA, M.A.; FERREIRA, S.L.C. **Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica**. Vitória da Conquista: UESB, 2006.

CHEMSPIDER - Search and Share Chemistry. Busca por: Sulfonamides. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8833097.html?rid=f9a9e1cd-4366-434e-9e63-00df3a9dcc93>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

COSTA, R.A. et al. Quantification of milk adulterants (starch, H₂O₂, and NaClO) using colorimetric assays coupled to smartphone image analysis. **Microchemical Journal**, v. 156, art. 104968, 2020.

DE ALCÂNTARA-RODRIGUEZ, I. et al. Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods. **Advances in Applied Microbiology**, v. 112, p. 143–183, 2020.

ERBETTA, G.M. **Degradação fotocatalítica de sulfonamidas**. 2017. fl. 104. Dissertação, Universidade Estadual De Campinas (UNICAMP), Campinas, 2017.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127–133, 2007.

FELTRIN, C.W. et al. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 80–82, 2007.

FENG, W. et al. Determination of melamine concentrations in dairy samples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 147–153, 2012.

FERNANDES, C.B. **Desenvolvimento de métodos limpos para *screening* e determinação de sulfonamidas em matrizes diversas**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2011.

FERNANDES, G.M. et al. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 187–203, 2020.

FLOREZ-CUADRADO, D. et al. Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 86 p. 115–136, 2018.

FULGÊNCIO, A.C.C. et al. Development of a Simple and Rapid Method for Color Determination in Beers Using Digital Images. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 1, p. 303–312, 2020.

GU, T.; GALERA-GÓMEZ, P.A. Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 104, n. 2–3, p. 307–312, 1995.

HAJIAN, R.; MOUSAVI, E.; SHAMS, N. Net analyte signal standard addition method for simultaneous determination of sulphadiazine and trimethoprim in bovine milk and veterinary medicines. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 745–749, 2013.

HWANGBO, S.; ÖNER, M.; SIN, G. Design of smart liquid-liquid extraction columns for downstream separations of biopharmaceuticals using deep Q-learning algorithm. **Computer Aided Chemical Engineering**. v. 46, p. 271–276, 2019.

KAZEMI, E. et al. Indirect spectrophotometric determination of sulfadiazine based on localized surface plasmon resonance peak of silver nanoparticles after cloud point extraction. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 187, p. 30–35, 2017.

LI, Z. et al. Determination of Sulfonamides in Milk by Cloud Point - Salting Out Extraction and Ultra High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 36, n. 12 p. 1555–1559, 2020.

LIU, J. et al. Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 679, n. 1–2, p. 74–80, 2010.

MADEJ, K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 436–446, 2009.

MAZUREK, J. et al. Antimicrobial Resistance in Commensal Escherichia coli from Pigs during Metaphylactic Trimethoprim and Sulfamethoxazole Treatment and in the Post-Exposure Period. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 2, p. 2150–2163, 2015.

MELNYK, A.; NAMIEŚNIK, J.; WOLSKA, L. A Critical Review of Surfactant-Mediated Phase Separations (Cloud-Point Extractions): Theory and Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 37–41, 1993.

NASCIMENTO, C.F.; ROCHA, D.L.; ROCHA, F.R.P. A fast and environmentally friendly analytical procedure for determination of melamine in milk exploiting fluorescence quenching. **Food Chemistry**, v. 169, p. 314–319, 2015.

NERO, L. A. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391–393, 2007.

NONG, C. et al. Dual-cloud point extraction coupled to high performance liquid chromatography for simultaneous determination of trace sulfonamide antimicrobials in urine and water samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1051, p. 9–16, 2017.

PALEOLOGOS, E.K.; GIOKAS, D.L.; KARAYANNIS, M.I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 426-436, 2005.

PASSARETTI FILHO, J. **Análise de imagens para fins analíticos: aplicações ambientais e tecnológicas**. 2015. 163 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2015.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

REMKO, M.; VON DER LIETH, C.W. Theoretical study of gas-phase acidity, pKa, lipophilicity, and solubility of some biologically active sulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 20, p. 5395–5403, 2004.

RIFKIND, D.; FREEMAN, G. L. Prontosil and the sulfonamides. In: RIFKIND, D. (Ed.). **The Nobel Prize Winning Discoveries in Infectious Diseases**. London: Elsevier, 2005. p. 39–42.

RIZZATTI, I.M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 518–521, 2009.

SAITO, H.; SHINODA, K. The stability of W/O type emulsions as a function of temperature and of the hydrophilic chain length of the emulsifier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 32, n. 4, p. 647–651, 1970.

ŞANLI, N. et al. Determination of pK a Values of Some Sulfonamides by LC and LC-PDA Methods in Acetonitrile-Water Binary Mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1952–1960, 2010.

SANTOS, P.M.; PEREIRA-FILHO, E. R. Digital image analysis-an alternative tool for monitoring milk authenticity. **Analytical Methods**, v. 5, n. 15, p. 3669–3674, 2013.

SCHLEMPER, V.; SACHET, A. P. Antibiotic residues in pasteurized and unpasteurized milk marketed in southwest of Paraná, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 12, e20170307, 2017.

SCIENCE DIRECT. Busca por: cloud point extraction - extração em ponto nuvem. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/search?q=cloud%20point%20extraction>>. Acesso em: 10 de janeiro 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. 107–299, 2020.

SILVA, S.G. da. **Desenvolvimento de procedimentos limpos para extração de íons metálicos em ponto nuvem**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SUKUL, P.; SPITELLER, M. Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 187, p. 67–101, 2006.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines for the validation of chemical methods for the FDA Foods Program**. 3. ed. Silver Spring, MD, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/81810/download>. Acesso em: 12 fev. 2021.

WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc (II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Talanta**, v. 25, n. 10, p. 585–589, 1978.

XIE, S. et al. Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2306–2317, 2010.

YU, F. et al. Ultrasound-assisted cloud point extraction for the determination of sulfonamides in honey samples by fluorescence spectrophotometry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3920–3926, 2013.

YUNIARTI, B. **The measurement of the water turbidity level using the turbidimeter which is based on the light scattering**. (Abstract em inglês - Medição da turbidez da água usando um turbidímetro baseado no princípio de espalhamento de luz). 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Física) – Departamento de Física, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonésia, 2007. Disponível em: <https://repository.usd.ac.id/2294/1/023214020.pdf>.

ZHANG, W.; DUAN, C.; WANG, M. Analysis of seven sulphonamides in milk by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 779–785, 2011.