

CURSO DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ

Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM LEITE UHT**

Rio de Janeiro

2015

Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM LEITE UHT**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Programa de Pós
Graduação em Vigilância Sanitária
do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação
Oswaldo Cruz para obtenção do
título de Especialista

Preceptora: Mychelle Alves Monteiro

Tutora: Bernardete Ferraz Spisso

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Santos, Julia Rodrigues Martins Pastor dos

Desenvolvimento de metodologias para a determinação de resíduos de sulfonamidas em leite UHT / Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

55 f., il.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2015.

Preceptor: Mychelle Alves Monteiro. Tutor: Bernardete Ferraz Spisso

1. Métodos. 2. Contaminação de Alimentos. 3. Leite. 4. Sulfonamidas. I. Título

Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM LEITE UHT**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Programa de Pós Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz para obtenção do título de Especialista

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Mychelle Alves Monteiro (Mestre) - Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rosana Gomes Ferreira (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora) - Tutora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela força concedida em mais essa etapa da minha caminhada.

Ao meu pai, Elison pelo cuidado, carinho e suporte.

À minha mãe Joana, pelos momentos dedicados aos cuidados comigo, abrindo mão de seus afazeres.

Aos meus avós, Joaquim e Elizabeth, pelo carinho.

Às minhas orientadoras Mychelle e Bernardete pela orientação, paciência, atenção e pelo incentivo.

Ao pessoal do laboratório Leandro, Rafaela, Rosana, Mararlene e Jair.

Às meninas da Residência Priscila, Ana Victoria, Shaiene, Cristiane e Bianca, pela amizade nesses dois anos.

Às minhas amigas de faculdade Bruna, Carla e Daniela, por estarem sempre ao meu lado.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

As sulfonamidas (SA) são uma classe de antimicrobianos sintéticos amplamente utilizada tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. São empregadas para tratar doenças, controlar e prevenir infecções e para a promoção do crescimento de animais produtores de alimentos, embora este último uso não seja autorizado no Brasil. No entanto, estes medicamentos podem causar efeitos adversos à saúde como problemas cardíacos, reações alérgicas, disfunções hepáticas e digestivas. Adicionalmente, tem aumentado a preocupação com a resistência bacteriana devido ao uso de antimicrobianos. O manejo inadequado dessas substâncias na medicina veterinária pode levar ao aparecimento de resíduos desses medicamentos nos alimentos em níveis inseguros à saúde humana. Para o controle de resíduos em alimentos foram criados programas que visam o monitoramento, baseados no atendimento aos LMR (Limites Máximos de Resíduos). O valor de LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi estabelecido no Brasil para o somatório de sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfametazina e sulfatiazol em leite, já a União Europeia (UE) considera o mesmo valor para o total combinado dos resíduos de todas as substâncias do grupo das SA. No âmbito da saúde, a Anvisa é o órgão responsável pelo Programa de Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) visa garantir a qualidade da produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC Animal. O objetivo deste trabalho foi propor uma metodologia para determinação de sulfonamidas em leite UHT (sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfacetamida, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, sulfatiazol e dapsona). A extração foi feita pelo método QuEChERS, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. O leite foi extraído com acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1 % com posterior adição de sulfato de magnésio e acetato de sódio. As amostras foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi levada à secura sob fluxo de nitrogênio e aquecimento e ressuspendidas em uma solução de 80 % de ácido fórmico 0,1 % em água e 20 % de metanol. As amostras foram analisadas por LC-MS/MS com ionização por eletrospray positivo (ESI+). O método desenvolvido foi considerado eficiente, obtendo-se boa separação entre os picos e boa linearidade no intervalo de 12,5 a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ com um $R^2 \geq 0,9868$. A recuperação dos analitos no método foi de 93 % a 103 %, com desvio padrão relativos ≤ 11 %. Os ensaios demonstraram ainda que o método é adequado para a análise das sulfonamidas considerando o LMR estabelecido pela legislação brasileira e europeia.

Palavras-chave: Espectrometria de massas. Leite. Sulfonamidas.

ABSTRACT

The sulfonamides (SA) are a class of synthetic antimicrobials widely used both in veterinary medicine and in human medicine. They are used to treat diseases, control and prevent infections and to promote the growth of food-producing animals, although this latter use is not authorized in Brazil. However, these medicines can cause adverse health effects such as heart problems, allergic reactions, liver and digestive disorders. In addition, there is growing concern about bacterial resistance due to the use of antimicrobials. The inadequate management of these substances in veterinary medicine can lead to the appearance of residues of such drugs in food at unsafe levels to human health. For residue control in food programs aimed at monitoring were created, based on compliance with MRL (Maximum Residue Limits). A MRL of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ has been established in Brazil for the sum of sulfadimethoxin, sulphaquinoxaline, sulfamethazine and sulfathiazole in milk. Whereas, European Union (EU) considers the same value for the combined total of residues of substances from the group of SA. In health, Anvisa is responsible for Residue Monitoring Program of Veterinary Drugs in Food of Animal Origin (PAMVet) and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) for ensuring the quality of production of food of animal origin along the supply chains through the National Plan for Control of Residues and Contaminants - Animal PNCRC. The objective of this study was to propose a methodology for determination of sulfonamides in UHT milk (sulfadimethoxin, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfacetamide, sulfamethoxazole, sulphaquinoxaline, sulfathiazole and dapsone). The extraction was carried out by QuEChERS method, which has the advantages of being fast, easy, economical, effective, robust and safe. Milk was extracted with acetonitrile acidified with 0.1 % formic acid with further addition of magnesium sulfate and sodium acetate. The samples were centrifuged and an aliquot of the supernatant was taken to dryness under nitrogen stream and heating and resuspended in a solution of 80 % formic acid 0.1 % in water and 20 % methanol. The samples were analyzed by LC-MS / MS using electrospray positive ionisation (ESI +). The developed method was efficient, resulting in good separation between the peaks and good linearity within the range of 12.5 to $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a $R^2 \geq 0.9868$. The recovery of the analytes in the method was from 93 % to 103 % with relative standard deviations ≤ 11 %. The experiments also showed that the method is suitable for the analysis of sulfonamides considering the MRL established by the Brazilian and the European legislation.

Key- words: Mass spectrometry. Milk. Sulfonamides.

LISTA DE SIGLAS

ACBR - Amostra controle branco de reagentes

ACC - Amostra controle conforme

ACN - Acetonitrila

ACNC - Amostra controle não conforme

ACNCFF - Amostra controle não conforme com fortificação no final do procedimento

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE - Collision energy

CG/MS- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CXP - Collision Cell Exit Potential

DAP- Dapsona

DIPOA - Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

DP - Declustering potential

DPR - Desvio padrão relativo

d-SPE - Extração por fase sólida dispersiva

EFS - Extração por fase sólida

ESI+ - Eletrospray positivo

FDA - *Food and Drug Administration*, Agência Americana para Alimentos e Medicamentos

FOA – Ácido fórmico

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH - Metanol

MERCOSUL - Mercado Comum do Sul

MRM – *Multiple reaction monitoring*, Monitoramento de Reações Múltiplas

NaOAc - Acetato de sódio

PAMVet - Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA - Sorvente de amina primária e secundária

QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, Rápido, Fácil, Econômico, Robusto e Seguro

RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SA - Sulfonamidas

SCT – Sulfacetamida

SDM – Sulfadimetoxina

SFM – Sulfamerazina

SMT – Sufametazina

SMZ – Sulfametoxazol

SQN – Sulfaquinoxalina

STZ – Sulfatiazol

TC- Tetraciclina

UE - União Europeia

UHT – *Ultra High Temperature*, temperatura ultra alta

USP - Farmacopeia Americana

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química das sulfonamidas.....	19
Figura 2 - Fluxograma do teste 1.....	28
Figura 3 - Fluxograma do teste 2.....	28
Figura 4 - Fluxograma do teste 3.....	29
Figura 5 - Fluxograma do teste 4.....	30
Figura 6 - Fluxograma do teste 5.....	31
Figura 7 - Fluxograma dos testes 6, 7 e 8.....	32
Figura 8 - Recuperação das sulfonamidas no método QuEChERS.....	39
Figura 9 - Desvio padrão relativo das sulfonamidas no método QuEChERS.....	40
Figura 10 - Cromatograma da amostra controle conforme (ACC).....	44
Figura 11 - Cromatograma da amostra controle branco de reagentes (ACBR).....	44
Figura 12 - Curva de calibração do sulfametoxazol na matriz leite.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de sulfonamidas	35
Tabela 2: Gradiente de eluição das sulfonamidas.....	36
Tabela 3: Técnicas de extração empregadas nos 8 experimentos	37
Tabela 4: Porcentagem de recuperação (R) média global e desvio padrão relativo (DPR) global das sulfonamidas em cada teste.....	42
Tabela 5: LOD e LOQ estimados para o método analítico.....	43
Tabela 6: Recuperação dos analitos em leite UHT integral.	45
Tabela 7: Linearidade das sulfonamidas na matriz.	45
Tabela 8: Leites UHT para verificar a presença de sulfonamidas.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1.1 Indústria leiteira no Brasil.....	16
1.2 OS MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	18
1.2.1 Definição de medicamentos veterinários	18
1.2.2 Antimicrobianos e sulfonamidas.....	18
1.2.3 Resíduos de medicamentos veterinários no Brasil: Regulamentação e Monitoramento	20
1.2.4 Métodos para determinação de resíduos de sulfonamidas em leite	22
2 OBJETIVO GERAL	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 PADRÕES ANALÍTICOS:	25
3.2 SOLVENTES E REAGENTES	25
3.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	25
3.4 PROCEDIMENTOS	26
3.4.1 Preparo das soluções-estoque.....	26
3.4.2 Preparo de soluções intermediárias e soluções de trabalho	27
3.4.3 Otimização do espectrômetro	27
3.4.4 Estudos de desenvolvimento de um método cromatográfico e espectrométrico para detecção das SA	27
3.4.5 Procedimentos de extração/purificação testados.....	27
3.4.5.1 <i>Extração líquido-líquido</i>	28
3.4.5.2 <i>Extração por fase sólida (EFS)</i>	29
3.4.5.3 <i>Método de QuEChERS</i>	30
3.5 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.....	32
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 ESTUDOS DE DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO E ESPECTROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DAS SA.....	35

4.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO TESTADOS	37
4.2.1 Extração líquido-líquido.....	38
4.2.2 Extração por fase sólida (EFS)	38
4.2.3 Método de QuEChERS	39
4.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	43
4.4 AMOSTRAS DE LEITE UHT ANALISADAS	43
4.4.1 Avaliação das amostras ACBR e ACC.....	43
4.4.2 Avaliação das recuperações dos analitos	45
4.5 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	45
4.6 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE UHT COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	46
5 CONCLUSÃO	48
6 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite e o primeiro da América do Sul, possuindo o maior rebanho comercial do mundo. Porém, atualmente a produção nacional só é capaz de fornecer à população brasileira aproximadamente 170 litros de leite/habitante/ano, quantidade inferior aos 210 litros recomendados pelos órgãos de saúde nacionais e internacionais (MAPA, 2014a).

Dados da Secretaria de Comércio Exterior indicam que, em 2012, as importações de leite em pó somaram cerca de US\$ 354 milhões e as exportações não superaram US\$ 1 milhão. Um dos impedimentos para ampliar a exportação de leite está relacionado à qualidade do produto, considerada inferior a da Argentina, do Uruguai, dos Estados Unidos e de países europeus. A pequena parcela exportada é destinada, em sua maior parte, a países africanos e da América Latina, provavelmente em virtude da não conformidade aos padrões de qualidade quando comparado aos padrões americanos e europeus (BNDES, 2014).

A melhoria da qualidade dos produtos laticínios visando à exportação irá depender da adoção de normas de controle para a contagem de bactérias e de células somáticas, que podem transmitir infecções e para a presença de resíduos de medicamentos veterinários. No Brasil, a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não permite o processamento do leite oriundo de animais que estejam sendo submetidos ao tratamento com medicamentos veterinários, de forma a assegurar que os resíduos dos fármacos não sejam superiores aos níveis fixados em normas específicas (BRASIL, 2011).

Medicamentos veterinários são usados em diversos países para prevenção e tratamento de doenças como mastite, pneumonia, diarreia e artrite, entre outras, bem como para estímulo do crescimento e controle da reprodução. A exposição humana a resíduos de medicamentos veterinários presentes nos alimentos pode causar efeitos adversos, incluindo reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis e até mesmo câncer, no caso de algumas substâncias proibidas. A exposição a antimicrobianos pode provocar o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, que dificulta a ação terapêutica desses medicamentos em indivíduos que consumiram alimentos de animais tratados. Resíduos de medicamentos veterinários

no leite podem também causar problemas tecnológicos nos processos de fermentação dos laticínios (BRINKMANN, 2014).

Os medicamentos utilizados na medicina veterinária são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação exercendo determinada ação terapêutica como antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, fungicida e sedativa (BRINKMANN, 2014).

As sulfonamidas (SA) são antimicrobianos de baixo custo, utilizados no tratamento de infecções bacterianas com amplo espectro de atuação. Elas competem com o ácido *p*-aminobenzóico, impedindo a sua utilização pelos micro-organismos na síntese do ácido fólico, essencial para a síntese de ácidos nucleicos. Deve-se ter cuidado com a administração dessas substâncias, pois seu uso inadequado pode levar ao aparecimento de resíduos no leite. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite interfere no processo industrial dos seus derivados, como citado anteriormente, inibindo o fermento láctico que é a base da produção de iogurtes, queijos e outros derivados, e conseqüentemente causando sérios prejuízos econômicos para o país (DENOBILO; NASCIMENTO, 2004). Portanto, o estabelecimento de Limites Máximos de Resíduos (LMR) para cada alimento é importante para monitorar o atendimento às boas práticas veterinárias e garantir produtos seguros e de qualidade para o consumidor (MARTIN, 2011).

No Brasil, a competência para estabelecer LMR em alimentos é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (ANVISA, 2014). Caso não exista um LMR estabelecido na legislação brasileira, podem ser utilizados os preconizados no Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), no *Codex Alimentarius*, nas Diretivas da União Europeia e os utilizados pela legislação americana através do *Food and Drug Administration* (FDA) (MARTIN, 2011).

Para o controle e a vigilância dos resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, o MAPA criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal) e a Anvisa criou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). O PNCRC/Animal objetiva verificar a eficácia dos autocontroles adotados pelo setor industrial de produtos de origem animal consumidos no Brasil e destinados à exportação e o PAMVet complementa as ações já desenvolvidas pelo MAPA, pois avalia o produto disponível para o consumo (FERREIRA et al, 2012).

Devido aos baixos LMR estabelecidos pelos órgãos internacionais e de regulação para medicamentos veterinários em produtos de origem animal, o uso ilegal de algumas substâncias e a complexidade das matrizes torna-se importante desenvolver metodologias analíticas sensíveis, seletivas e robustas. Para isso, é essencial a execução de várias etapas analíticas como: extração, eliminação de interferentes, separação, detecção e quantificação do analito (FERREIRA et al, 2012; PRESTES et al, 2013).

Inicialmente o método mais utilizado para extração de SA em leite era a extração líquido-líquido, mais tarde passou a ser substituída pela extração em fase sólida e atualmente o método de preparo de amostra denominado QuEChERS (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) é o mais utilizado por ser considerado rápido, simples e eficiente. Foi um método proposto em 2003 por Anastassiades e colaboradores para análise de pesticidas em alimentos e ao longo do tempo vem sofrendo várias modificações principalmente para análise de medicamentos veterinários em alimentos. A separação, detecção e quantificação dos analitos frequentemente são efetuadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003).

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Indústria leiteira no Brasil

O incentivo ao consumo de leite no Brasil começou a partir da década de 30, na era Vargas, em que as campanhas publicitárias tentavam convencer o leitor do alto valor do leite como alimento básico (BRINKMANN, 2014).

A nova ciência da nutrição introduzida em 1918 pelo bioquímico norte-americano e pioneiro da vitaminologia Elmer Verner McCollum declarava o leite de vaca como o mais importante, o qual não poderia faltar na nutrição cotidiana nem da criança nem do adulto. As novas hipóteses sobre o valor biológico do leite resultaram em uma nova orientação para as políticas de nutrição e também para a agropecuária. Em muitos países do norte o consumo do leite tornou-se prioridade essencial nas políticas sanitárias (BRINKMANN, 2014).

Em 29 de março de 1952 Getúlio Vargas assinou o Decreto 30.691, aprovando o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), obrigando a realização da pasteurização, assim como a inspeção e o carimbo do Serviço de Inspeção Federal. Esse decreto está em vigor até os dias atuais e representou o marco em busca da qualidade na produção do leite (BRINKMANN, 2014).

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 sexto maior produtor de leite. A pecuária leiteira é uma das atividades mais tradicionais do meio rural brasileiro. O valor bruto da produção de leite contribui para movimentar a economia das pequenas e médias cidades brasileiras. Um fator que impede o país de atingir mercados mais exigentes é a qualidade do produto lácteo brasileiro. Um exemplo é a presença de resíduos de medicamentos veterinários no leite (MAPA, 2014a).

Para que o país possa aproveitar o cenário favorável ao crescimento da indústria de laticínio por causa do aumento do consumo interno e da demanda externa, o Brasil deve superar alguns desafios importantes como o aumento de produtividade e da qualidade e segurança dos produtos finais (MAPA, 2014a).

Diante da importância estratégica do setor no Brasil, o MAPA desenvolveu um conjunto de ações que serão organizadas na forma de um plano de incentivo à pecuária bovina, denominado plano mais pecuária. Esse plano tem por objetivo aumentar a competitividade da pecuária bovina de leite através do Programa Mais Leite, tendo como um dos eixos a segurança e a qualidade desse produto (MAPA, 2014a).

O RIISPOA proíbe a adição de qualquer substância química no leite destinado à alimentação humana. O leite contaminado por substâncias químicas pode representar um risco à saúde e sua identificação constitui um dos princípios fundamentais na análise de pontos críticos de controle. A pasteurização, fervura e esterilização do leite não destroem os resíduos de antimicrobianos, representando possível risco para o consumidor e problema para a indústria. As razões para se fazer o controle dos resíduos de antimicrobianos no leite incluem a possibilidade do surgimento de reações alérgicas nos consumidores e contribuição para a resistência bacteriana, além de ser também um problema econômico, interferindo nas culturas lácteas utilizadas na fabricação de derivados (BRASIL, 1952).

1.2 OS MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

1.2.1 Definição de medicamentos veterinários

O MAPA classifica medicamentos veterinários como

Toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo vacinas, medicamentos, antissépticos e qualquer produto utilizado nos animais que modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas (MAPA, 2014b).

Medicamentos veterinários são usados em diversos países para o tratamento de doenças e para a proteção da saúde dos animais. Além disso, eles são incorporados na alimentação animal para melhorar a taxa de crescimento e a eficiência alimentar (SARMAH et al, 2006).

As diversas classes de medicamentos utilizados na medicina veterinária são classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação exercendo determinada ação terapêutica como antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, fungicida e sedativa (SARMAH et al, 2006).

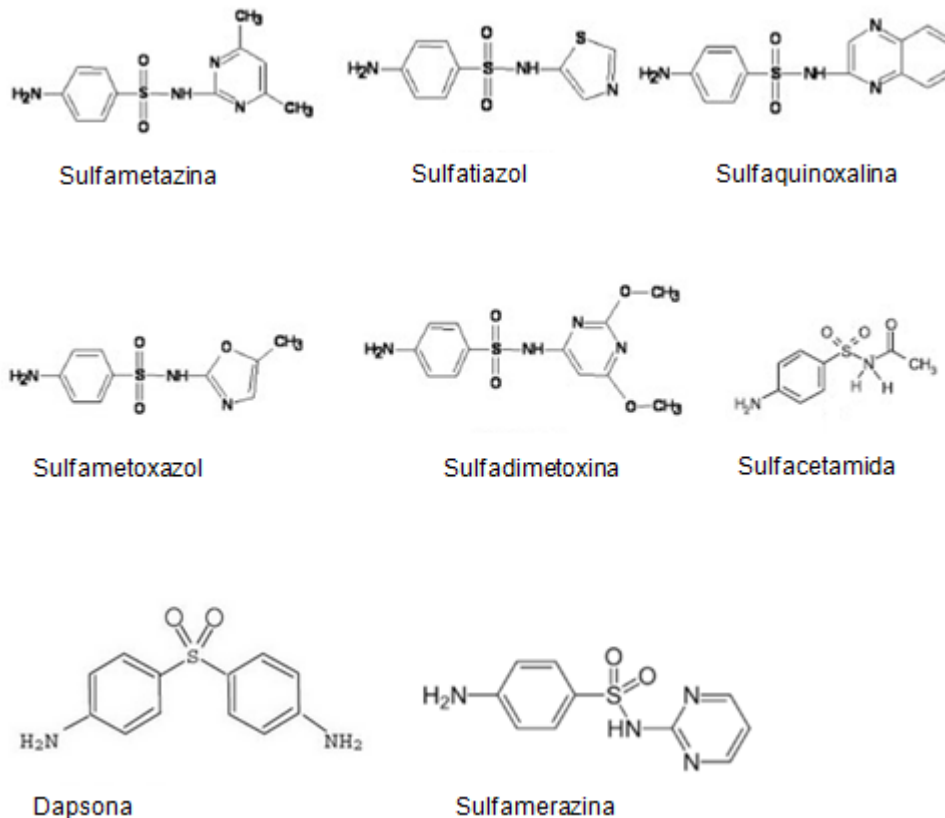
1.2.2 Antimicrobianos e sulfonamidas

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos e bactérias. São classificados em bactericidas e bacteriostáticos. Um antimicrobiano bactericida é aquele que causa a morte da bactéria, já um antimicrobiano bacteriostático é responsável pela inibição do crescimento bacteriano (GUIMARAES et al, 2010).

Em 1910 o pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, foi o pioneiro a levantar a hipótese de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de micro-organismos em concentrações não tóxicas para o hospedeiro. Paul Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico, Salvarsan®, usado contra a sífilis. Em 1935, Gerhard Domagk desenvolveu o Prontosil, que originou uma nova classe de antibióticos sintéticos, marcando o início da moderna era da quimioterapia antimicrobiana, com as sulfonamidas, antimicrobianos bacteriostáticos utilizados como primeira classe contra infecções sistêmicas (GUIMARAES et al,

2010). As estruturas das sulfonamidas estudadas nesse trabalho encontram-se na figura 1.

Figura 1 - Estrutura química das sulfonamidas.



As sulfonamidas de maior importância clínica em humanos são a sulfadiazina e sulfametoxazol. O sulfametoxazol é usado em associação com o trimetoprim para pacientes com infecção do trato urinário e também para pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida infectados por *Pneumocystis carinii* (GUIMARAES et al, 2010).

Além do uso na medicina humana, os antimicrobianos podem ser utilizados na medicina veterinária no tratamento de doenças no gado leiteiro e também na suplementação alimentar (DENOBILE; NASCIMENTO, 2004). A maioria das SA causam sérios problemas para a saúde humana, entre os quais reações alérgicas ou tóxicas. Algumas SA podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se ainda

que aproximadamente 5 % dos pacientes humanos que são tratados com SA sofrem efeitos colaterais (ALABURDA et al, 2007).

1.2.3 Resíduos de medicamentos veterinários no Brasil: Regulamentação e Monitoramento

Segundo a Constituição Federal de 1988, a saúde é um direito de todos e um dever do Estado. E nessa nova concepção se incluem as ações de Vigilância Sanitária. A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, chamada Lei Orgânica da Saúde, organiza o Sistema Único de Saúde e definiu a Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir, riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da Saúde”. (BRASIL, 1990; ROSENFELD, 2009).

No Brasil o campo da regulamentação, e, conseqüentemente a produção de normas foi ampliado devido ao processo de industrialização. A criação dos centros de pesquisas e dos laboratórios de saúde pública contribuiu para a prática da Vigilância Sanitária. Nos Estados Unidos, por exemplo, a produção industrial de alimentos e de medicamentos cresceu juntamente com muitas denúncias de adulteração e falsificação de produtos e de utilização abusiva de conservantes. As análises laboratoriais disponíveis para o público foram essenciais para a movimentação popular em busca por medidas de proteção à saúde, resultando na ampliação da legislação de controle (MERCOSUL, 2000; ROSENFELD, 2009).

De acordo com a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, a Anvisa é o órgão brasileiro de fiscalização e controle na área de vigilância sanitária, que através da Resolução GMC nº 54/2000 (Mercosul) internalizada pela Resolução RDC nº53, de 02 de outubro de 2012, estabeleceu LMR para alguns medicamentos veterinários incluindo antimicrobianos em concentrações aceitáveis (BRASIL, 1999a; FERREIRA et al, 2012).

O LMR é a concentração máxima (expressa em mg kg^{-1} , $\mu\text{g kg}^{-1}$, mg L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$) que se permita legalmente ou que se reconheça como admissível em um alimento (ANVISA, 2014). Este limite baseia-se no tipo e quantidade de resíduos que não apresentam risco de toxicidade para a saúde humana, levando-se em consideração a Ingestão Diária Aceitável (FERREIRA et al, 2012). A Anvisa

considera um LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das três SA sulfadimetoxina, sulfametazina e sulfatiazol, tendo como referência o Mercosul. Para as SA estudadas não foram encontrados valores de LMR para o leite no *Codex Alimentarius* nem na Agência Americana para Alimentos e Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*). Para a União Europeia (UE) o total combinado dos resíduos de todas as substâncias do grupo das sulfonamidas não pode ultrapassar $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; esse LMR foi estabelecido através do regulamento (CEE) N° 675/92 da Comissão, de 18 de março de 1992 (JOCE, 1992).

O objetivo do PAMVet é avaliar resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino, carne de frango, carne bovina, carne suína, pescado, ovo de galinha e mel de abelha. Esses alimentos são bastante consumidos pela população, de acordo com o relatório da pesquisa de orçamento familiar. O leite aparece como o alimento de origem animal mais consumido pela população brasileira. Os dados de consumo e importância na alimentação definiram a escolha do leite bovino como a primeira matriz de análise do PAMVet. Os tipos de leite escolhidos para serem analisados foram leite integral em pó e leite integral fluido em embalagem longa vida (UHT, *ultra high temperature*) (ANVISA, 2014).

O MAPA possui programas que prezam pela manutenção das boas práticas na produção do leite e pela inspeção dos produtos de origem animal disponíveis para consumo. O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC/Animal instituído pela Instrução Normativa SDA N° 42, de 20 de dezembro de 1999 tem por objetivo garantir as boas práticas na cadeia produtiva animal. O PNCRC/Animal é composto pelos seus programas setoriais para o monitoramento em carnes e demais produtos de origem animal como o leite, mel, ovos e pescado. Já o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) é responsável pela inspeção de produtos de origem animal; logo o desembarque dos produtos de origem animal no Brasil depende da autorização do MAPA, por meio desse departamento (BRASIL, 1999b).

A Instrução Normativa n° 62/2011, do MAPA, exige a pesquisa regular de resíduos de antimicrobianos em leite, esses não devem ser superiores aos LMR previstos para cada grupo químico específico. Os LMR de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal harmonizados no âmbito do Mercosul pela Resolução Grupo Mercado Comum (GMC) n° 54, de 29 de setembro de 2000, foram internalizados no Brasil pelo MAPA através da Instrução Normativa n° 12, de

10 de abril de 2001 e pela resolução RDC nº 53 da Anvisa, de 02 de outubro de 2012 (BRASIL, 2011; BRASIL, 2001).

Uma das diretrizes do Programa Mais Leite, citada anteriormente é acompanhar a adequação dos resultados das análises dentro dos padrões da IN 62/2011, do Programa Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes e modernização da legislação em vigor (RIISPOA) (MAPA, 2012a).

1.2.4 Métodos para determinação de resíduos de sulfonamidas em leite

Na maior parte das análises químicas, principalmente nas análises de resíduos, nas quais os analitos se encontram em nível de traços, $\mu\text{g kg}^{-1}$ a ng kg^{-1} , é necessário à realização de uma etapa prévia de preparo de amostra. Essa etapa também é importante devido às baixas concentrações dos analitos e a complexidade da matriz. Os principais objetivos do preparo de amostra são promover a extração e, muitas vezes, a concentração dos analitos de interesse e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. Essa etapa é crucial e consome muito tempo no processo analítico, consumindo cerca de 80 % do tempo total de análise (JARDIM, 2010).

A extração líquido-líquido e sólido-líquido, utilizadas durante décadas, consistem na extração sucessiva de amostras líquidas e sólidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando agitação vigorosa. Geralmente, a maioria destas técnicas emprega solventes orgânicos em alguma de suas etapas. A acetonitrila (ACN) é considerada um dos melhores solventes, uma vez que promove uma extração bastante eficiente e também promove a desnaturação de proteínas. O metanol (MeOH) e o acetato de etila também são amplamente utilizados, porém extraem elevadas quantidades de componentes lipofílicos e outros interferentes da matriz (PRESTES et al, 2013).

Na extração líquido-líquido ocorre a transferência de soluto entre duas fases imiscíveis entre si. A escolha adequada do solvente orgânico e o ajuste de pH da amostra são necessários para uma boa recuperação do analito. A eficiência da extração está relacionada dentre outros fatores 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. Além disso, nesse tipo de extração, as

proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, contribuindo para a diminuição da contaminação da coluna cromatográfica (QUEIROZ, 2001).

A extração por fase sólida (EFS) apresenta-se como uma alternativa aos métodos descritos. Neste método um sorvente com alta afinidade para determinados analitos irá reter e concentrar os compostos de uma amostra líquida ou em solução. A técnica de EFS envolve o uso de cartuchos descartáveis, permitindo tanto a remoção de substâncias interferentes quanto a concentração dos analitos; além disso, em comparação com a extração líquido-líquido a técnica de EFS apresenta como vantagem o menor gasto de solvente orgânico, atendendo aos princípios da Química Verde, pois reduz os riscos impostos à população e ao meio ambiente como um todo (PRESTES et al, 2013).

Outro método que vem sendo considerado promissor na extração de diversos compostos em matrizes alimentícias, e tem sido modificado conforme o interesse da análise é o método QuEChERS, introduzido em 2003 por Anastassiades e colaboradores (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003). A proposta inicial era o desenvolvimento de uma metodologia mais simples e rápida utilizada para análise de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais. O desenvolvimento da metodologia envolveu extração líquido-líquido e extração por fase sólida dispersiva (d-EFS). Inicialmente foi realizada a extração de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila. Uma partição líquido-líquido foi formada pela adição de 4 g de $MgSO_4$ anidrido e 1 g de NaCl. A remoção da água residual foi realizada por meio da extração dispersiva por fase sólida, em que 150 mg de $MgSO_4$ anidro e 25 mg do sorvente de amina primária e secundária (PSA) foram misturados com um 1 mL de acetonitrila. O d-EFS com PSA removem eficazmente muitos componentes polares da matriz, tais como ácidos orgânicos, certos pigmentos polares e açúcares. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS) foi então utilizada para análise quantitativa e confirmativa dos pesticidas (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003).

2 OBJETIVO GERAL

Propor uma metodologia para determinação das SA: sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfacetamida, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, sulfatiazol e dapsona em leite UHT.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método rápido e eficaz de identificação e quantificação de sulfonamidas em leite;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de leite UHT disponíveis para consumo da população da cidade do Rio de Janeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A busca de dados sobre as substâncias da classe das SA que fazem parte do PAMVet e do PNCRC/Animal foi feita nos sites da Anvisa e do MAPA. Cruzou-se os dados desses órgãos com referências internacionais e foram selecionadas as substâncias no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários e no Laboratório de Substâncias Químicas de Referência do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

3.1 PADRÕES ANALÍTICOS:

Os padrões utilizados no desenvolvimento da metodologia foram todos da Farmacopeia Americana (USP), (sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfacetamida, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, sulfatiazol e dapsona).

3.2 SOLVENTES E REAGENTES

Acetato de sódio anidro Merck® (NaOAc, Lote: B0755964 342, pureza 99,99 %), ácido fórmico Merck® (FOA, Lote: I548270032, pureza 98-100 %), sulfato de magnésio Merck® (MgSO₄, Lote: K42484067 147, pureza ≥ 98 %)

Metanol grau cromatográfico foi obtido da Baker (Lote: 0000066 139, pureza 99,96 %). Acetonitrila para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas LC/MS foi fornecida pela Merck (Lote: I622129 204, pureza ≥ 99,9 %).

Água ultrapura foi gerada por sistema de purificação Milli-Q-A-10 (Millipore).

3.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Os equipamentos utilizados para as etapas de extração, preparo de soluções e armazenamento foram:

- Balança semi-micro com resolução de 0,00001 g (Metler Toledo, Suíça);
- Balança analítica LP620P (Sartorius, Alemanha);
- Módulo de aquecimento com unidade de evaporação com gás nitrogênio React-Therm III (Pierce, EUA);

- Termômetro digital de imersão parcial para módulo de aquecimento (-50 °C a +70 °C) (VWR, EUA);
- Centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- Sistema de obtenção de água ultrapura, Milli-Q (Millipore, EUA);
- Agitador de tubos tipo vórtex (MARCONI, Brasil);
- Freezer de ultra-baixa temperatura CL374-80V (ColdLab, Brasil);
- Refrigerador Frost Free DF34 (Electrolux, Brasil);
- Capela de exaustão.

Para a separação e detecção das substâncias foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), este equipamento empregado é composto de:

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência, composto de bomba quaternária LC-20AD, degaseificador de membrana DGU-20A5, auto-amostrador SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e bomba controladora CBM-20A (Shimadzu Prominence, EUA).
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo API5000 (Applied Biosystems/MDS Sciex com fonte TurbolonSpray®), controlado pelo software Analyst® versão 1.4.2 da mesma empresa.
- Coluna analítica Pursuit™ C18 RS, 100 mm de comprimento x 2 mm de diâmetro interno x 3 µm de tamanho de partícula, 200 Å de poro (Varian, Part No. A3001100X020);
- Coluna de guarda Metaguard C18 Pursuit, 2 mm de diâmetro interno, 3 µm de tamanho de partícula (Varian, Part No. A3001MG2).

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Preparo das soluções-estoque

As massas teóricas pesadas de cada padrão para o preparo das soluções-estoque na concentração nominal de 1000 µg mL⁻¹ em metanol foram calculadas considerando correções de pureza, teor de água e ácido livre. As soluções estoque foram transferidas para microtubos e estocadas a temperaturas ≤ a -70 °C em freezer de ultra-baixa temperatura.

3.4.2 Preparo de soluções intermediárias e soluções de trabalho

As soluções estoques foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL. Foram preparadas soluções de trabalho para o ácido oxálico na concentração de 0,01 mol/L em H₂O, para o posterior preparo da solução de trabalho de 80 % ácido oxálico 0,01 mol/L / 20 % MeOH; acetonitrila acidificada com ácido oxálico 0,01 mol/L e 4 % FOA em MeOH. Também foram preparados FOA 0,1 % em H₂O; FOA 0,1 % em ACN; H₂O : ACN (1:1) com 0,1 % FOA; 80 % FOA 0,1 % em H₂O : 20 % MeOH. Partindo das soluções estoque a 1000 µg/mL, o mix das SA foi preparado a 10 µg/mL, 2 µg/mL, 250 ng/mL, 5 ng/mL. As curvas foram preparadas nas concentrações : 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 2 µg/mL; 3 µg/mL; 4 µg/mL; 5 µg/mL e 6 µg/mL.

3.4.3 Otimização do espectrômetro

A otimização das condições ideais de ionização das SA no modo eletrospray positivo (ESI+) no espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) foi realizada através da infusão contínua de soluções individuais dos analitos na concentração de 100 ng mL⁻¹ em MeOH, com auxílio de uma bomba de seringa (Havard Apparatus, Canadá).

3.4.4 Estudos de desenvolvimento de um método cromatográfico e espectrométrico para detecção das SA

Os testes cromatográficos realizados basearam-se em um método pré-existente no laboratório para a detecção de antimicrobianos da classe das tetraciclina (TC) em leite devido às semelhanças físico-químicas das TC com as SA.

3.4.5 Procedimentos de extração/purificação testados

Diversos testes foram realizados a fim de obter-se o método com melhores recuperações e maior praticidade. Testou-se o solvente de extração, comparando-se acetonitrila acidificada com ácido oxálico e com ácido fórmico (FOA). Realizou-se testes com e sem extração por fase sólida para comparação com o método

QuEChERS e também variou-se a concentração dos sais sulfato de magnésio e acetato de sódio.

3.4.5.1 Extração líquido-líquido

A concentração do mix das SA utilizada nesse primeiro teste foi de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. No método de TC o volume utilizado de ACN acidificada com ácido oxálico 0,1 % foi de 1,9 mL (SPISSO et al, 2009), porém como esse teste é somente uma extração líquido-líquido, resolveu-se aumentar o volume de ACN acidificada com ácido oxálico 0,1 % para $4400 \mu\text{L}$, e não foi feito o *clean-up* com EFS, como demonstrado na Figura 2. No teste 2 utilizou-se ACN acidificada com FOA 0,1 %, pois testes realizados com FOA, obteve-se um aumento nas respostas dos analitos e diluente 20 % MeOH / 80 % FOA 0,1 %, conforme Figura 3.

Figura 2 - Fluxograma do teste 1

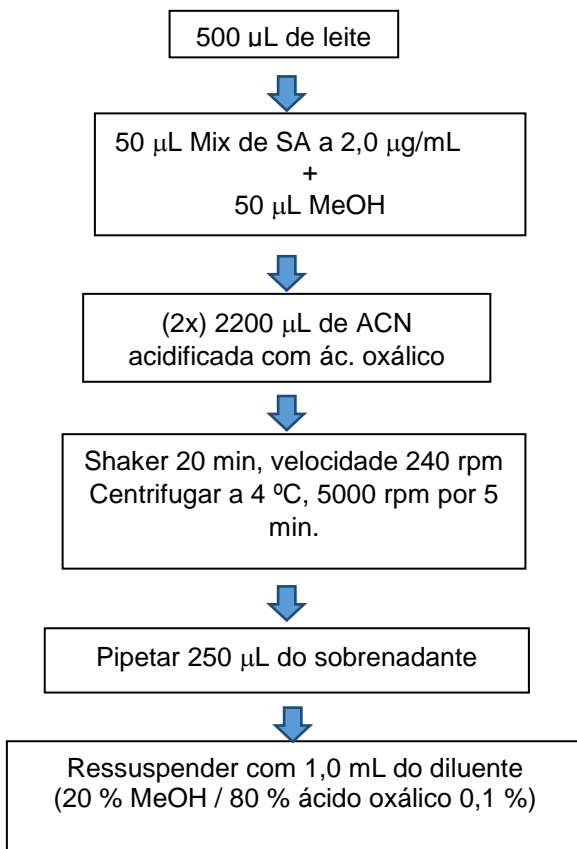
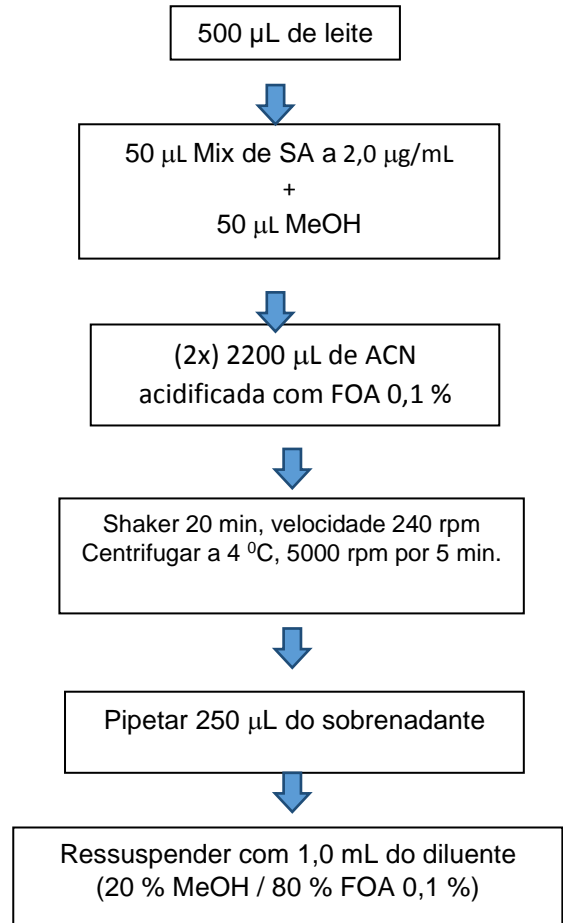


Figura 3 - Fluxograma do teste 2

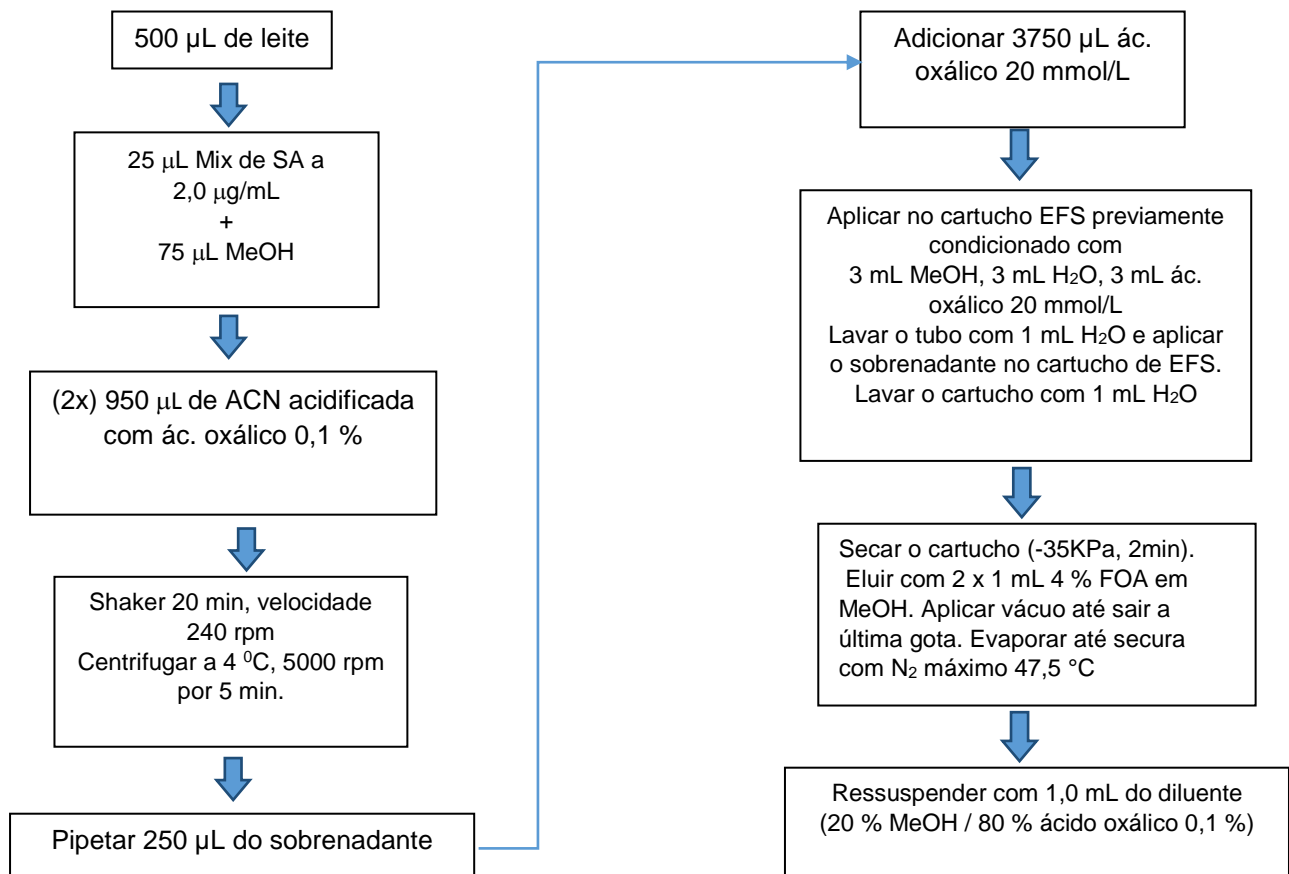


3.4.5.2 Extração por fase sólida (EFS)

Os procedimentos de extração e purificação testados basearam-se inicialmente nos testes realizados por Spisso e colaboradores (2009), onde um método de extração por fase sólida para determinação de resíduos de tetraciclina (TC) em leite foi desenvolvido. Essa metodologia foi inicialmente testada devido às semelhanças físico-químicas entre as TC e SA.

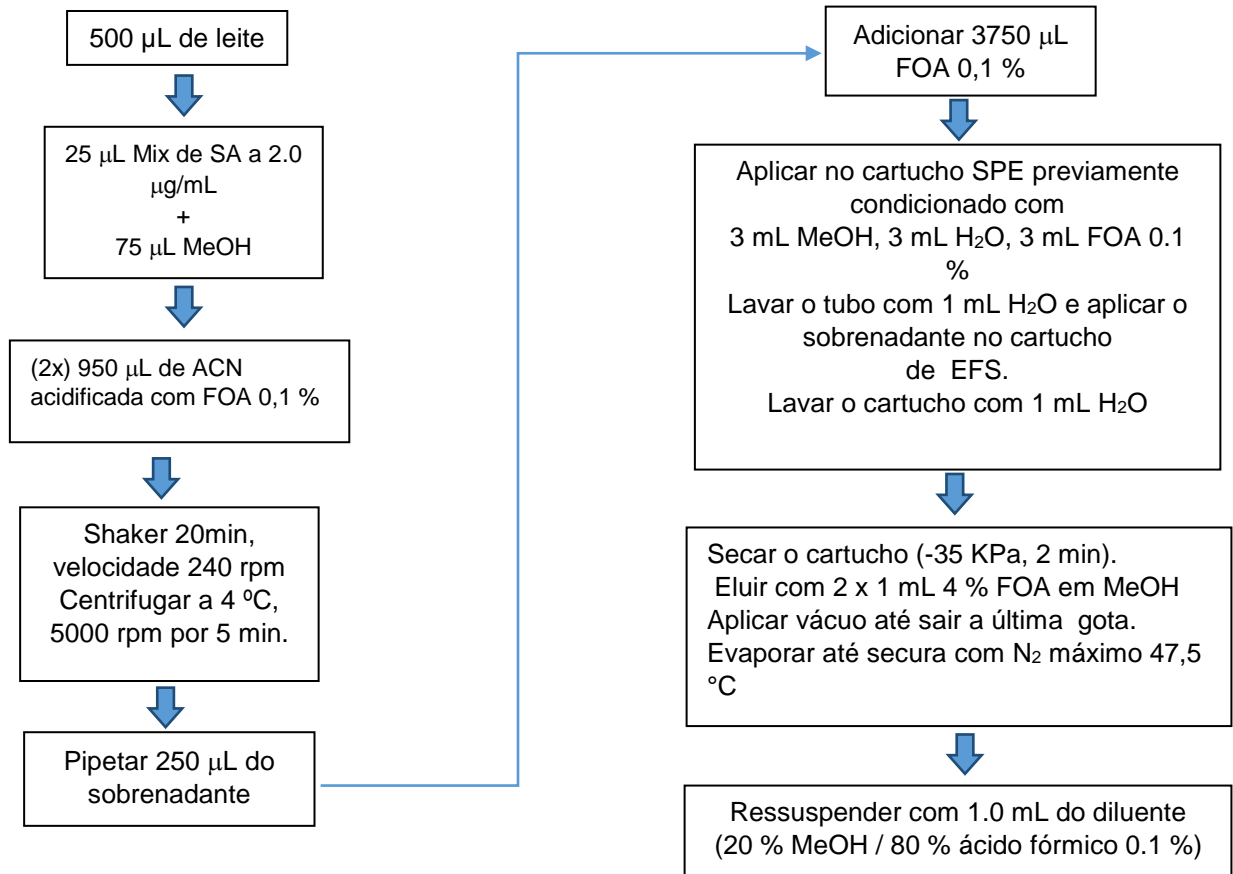
O terceiro teste consistiu na extração por fase sólida - a amostra foi pré-tratada com acetonitrila acidificada com ácido oxálico, com o objetivo de separar proteínas e gorduras do leite. O método de extração por fase sólida (EFS) envolve a utilização de um cartucho com fase sólida polimérica, Oasis HLB®, onde a amostra é inserida na parte superior do cartucho e, após percorrer o cartucho, o analito retido na fase sólida é eluído com FOA 4 % em MeOH. A metodologia do teste 3 está exposta na Figura 4:

Figura 4 - Fluxograma do teste 3.



No teste 4 substituiu-se a ACN acidificada com ácido oxálico 0,1% por ACN acidificada com FOA 0,1%, conforme a Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma do teste 4.



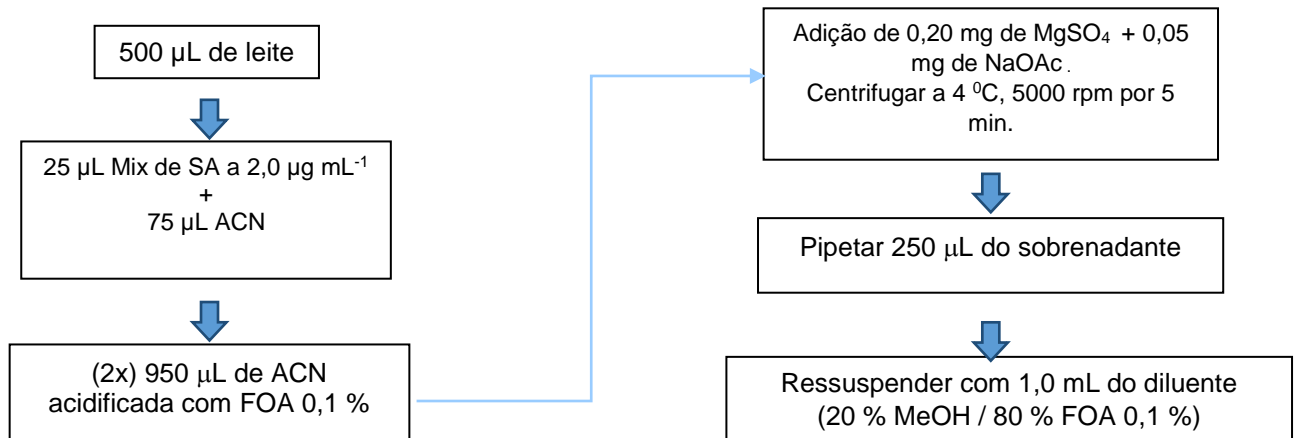
3.4.5.3 Método de QuEChERS

Devido à praticidade do método QuEChERS e ótimas experiências obtidas no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários, esse método foi testado para concentração e limpeza (*clean-up*) das amostras. O método fundamenta-se em uma fase de extração líquido-líquido com um solvente orgânico e aplicação de sal secante sulfato de magnésio para melhorar a recuperação e o uso do sal acetato de sódio para promover o efeito *salting out*, a fim de diminuir a solubilidade dos analitos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica (PRESTES et al., 2009).

A escolha do solvente de extração nesse método é uma etapa muito importante. A acetonitrila é um solvente miscível em água e promove a extração em uma única fase quando em contato com o leite. Quando o sal é adicionado ocorre a separação da fase orgânica e da fase aquosa, não sendo necessário a adição de outros solventes apolares (PRESTES et al., 2009).

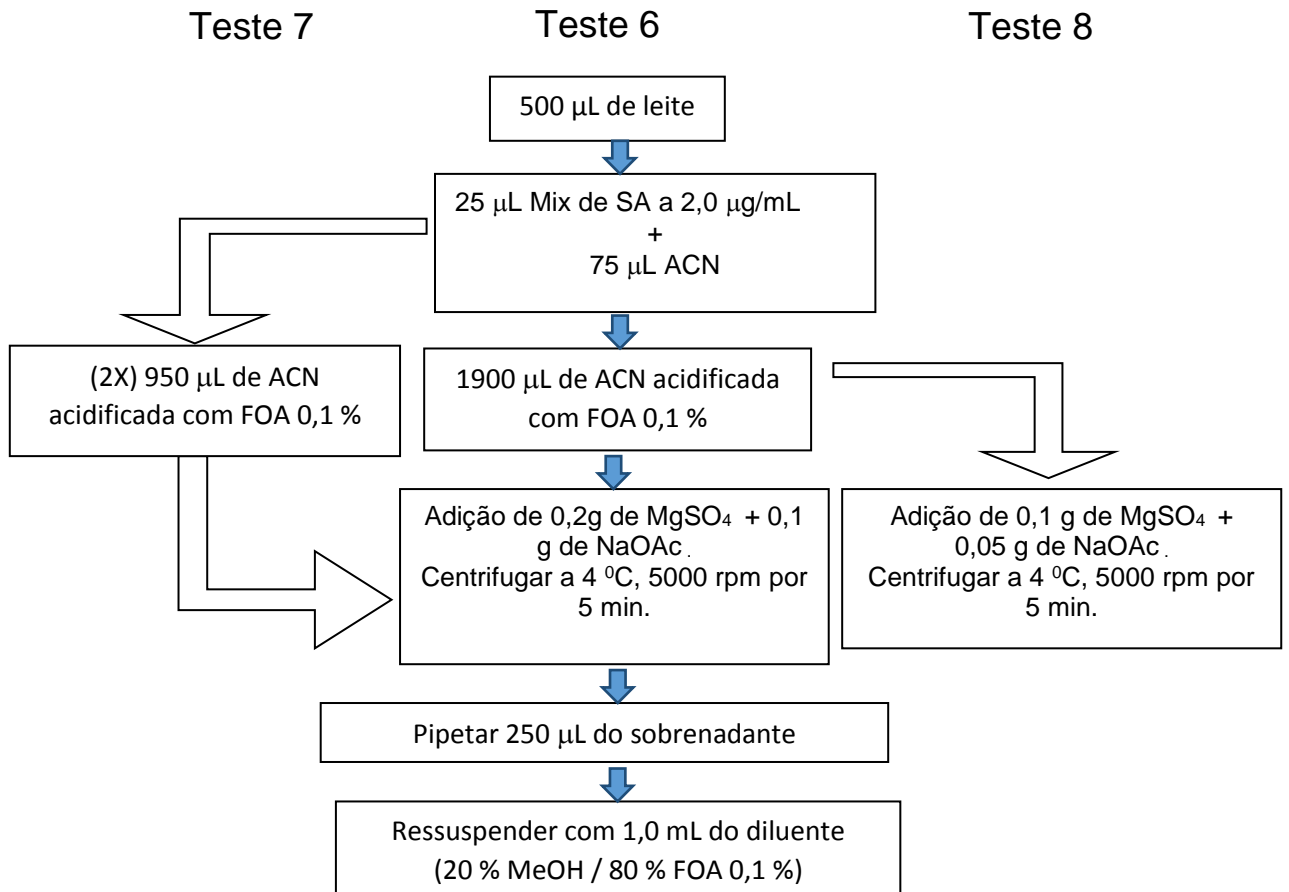
No teste 5 foi introduzido o método QuEChERS, utilizando-se os sais MgSO_4 e NaOAc para a etapa de extração e *clean-up* da amostra, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma do teste 5.



A partir do teste 5 variou-se as concentrações dos sais nos testes 6, 7 e 8 como demonstrado na figura 7.

Figura 7 - Fluxograma dos testes 6, 7 e 8.



3.5 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras de leite UHT foram obtidas em supermercados da região metropolitana do Rio de Janeiro. A maioria das amostras já se encontravam disponíveis no laboratório (armazenadas em freezer a temperatura inferior a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$). As amostras de leite UHT foram homogeneizadas manualmente e transferidas para tubos de centrífuga de polipropileno. Todas as amostras foram armazenadas em freezer de ultra baixa temperatura ($\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$) e descongeladas sempre que necessário para uso.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO

O ensaio das 20 amostras comerciais de leite UHT foi composto das seguintes amostras:

- Amostra controle branco de reagentes (ACBR): água como substituto da amostra branca, sem analitos alvos. Pipetou-se 500 μL de água purificada em um tubo de centrífuga de 15 mL. Adicionou-se 25 μL de metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

- Amostra controle conforme (ACC) – amostra de matriz isenta da substância a analisar. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL de metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

- Amostra controle não conforme (ACNC) – amostra de matriz que será analisada contendo concentrações dos analitos iguais ao LMR. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

- Amostra controle não conforme com fortificação no final do procedimento (ACNCFF) – amostra de matriz isenta da substância a analisar. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL de metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 7 (teste 8), porém a reconstituição do eluato seco foi feita com 1 mL da solução de trabalho mix a 6,25 ng mL^{-1} .

As amostras ACNC e ACNCFF são utilizadas para calcular a porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico.

- Curva de calibração na matriz (P1 ao P7): A concentração das sulfonamidas nas amostras é calculada por interpolação a partir de curvas de calibração construídas com amostras brancas de leite fortificadas a 0,125; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 LMR. As curvas de calibração foram construídas da seguinte forma:

- a) P1 – amostra branca fortificada com os analitos na concentração equivalente a 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL.

Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

b) P2 – amostra branca fortificada com os analitos na concentração equivalente a $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

c) P3 – amostra branca fortificada com os analitos na concentração equivalente a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

d) P4 – amostra branca fortificada com os analitos na concentração equivalente a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

e) P5 – amostra branca fortificada com os analitos na concentração equivalente a $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

f) P6 – amostra branca fortificada com os analitos na concentração equivalente a $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8).

g) P7 – amostra branca fortificada com os analitos na concentração equivalente a $250 \mu\text{g L}^{-1}$. Pipetou-se uma alíquota de 500 μL de uma amostra de leite comprovadamente branca em tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 25 μL da solução de trabalho mix a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e 75 μL de acetonitrila. Prosseguiu-se com o procedimento descrito na Figura 8 (teste 8)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDOS DE DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO E ESPECTROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DAS SA

A otimização do espectrômetro consiste no ajuste dos parâmetros relativos à fonte de íons e dos parâmetros relativos aos analitos para maximizar a resposta do espectrômetro de massas para cada substância analisada. Os valores de DP, CE e CXP para as transições íon precursor/íons produto das SA obtidos no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) encontram-se na Tabela 1.

Quando se realizou a otimização foram selecionados quatro íons precursores, o recomendado é que se faça o monitoramento de pelo menos duas transições (par de íons precursor/produto) para cada substância, sendo uma para identificação e a outra para quantificação, conforme os critérios descritos na Decisão 2002/657/EC (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Embora duas transições fossem suficientes, três transições para cada analito foram selecionadas. A transição de MRM mais intensa foi escolhida para a quantificação e duas transições adicionais foram monitoradas para confirmação.

Tabela 1: Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de sulfonamidas

Analito	Tempo de retenção (min)	Íon precursor	Íon produto	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Sulfametazina	6,44	279,213	149,200	111,0	41,0	12,0
			204,100		37,0	16,0
			124,100		25,0	14,0
			108,200		25,0	16,0
Sulfacetamida	3,40	215,140	156,100	71,0	29,0	14,0
			108,000		33,0	16,0
			110,000		65,0	22,0
			115,100		15,0	16,0
Sulfametoxazol	10,50	254,178	156,100	116,0	33,0	14,0
			108,200		23,0	22,0
			147,200		23,0	16,0
			160,100		27,0	20,0
Sulfaquinoxalina	15,23	301,340	108,100	141,0	39,0	12,0
			118,100		61,0	14,0
			146,200		33,0	14,0
			156,100		25,0	22,0

Tabela 2: Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de sulfonamidas

Analito	Tempo de retenção (min)	Íon precursor	Íon produto	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Sulfatiazol	4,21	256,300	156,100	91,0	33,0	18,0
			108,100		33,0	16,0
			101,100		37,0	14,0
			110,100		21,0	16,0
Dapsona	7,64	249,300	108,100	156,0	31,0	12,0
			110,200		37,0	14,0
			156,000		21,0	20,0
			231,200		17,0	18,0
Sulfadimetoxina	14,66	311,160	108,100	141,0	41,0	14,0
			156,300		29,0	10,0
			173,100		43,0	26,0
			245,200		27,0	16,0
Sulfamerazina	4,85	265,246	108,200	96,0	37,0	10,0
			110,200		35,0	10,0
			156,200		25,0	10,0
			190,100		23,0	14,0

O sistema de cromatografia líquida em fase reversa com gradiente de eluição ternário para as sulfonamidas, composto por fases móveis A, B e C que consiste em H₂O, ACN e MeOH, respectivamente, com 0,1 % FOA; o volume de injeção e a temperatura da coluna estão descritos na Tabela 2.

Tabela 3: Gradiente de eluição das sulfonamidas.

Tempo (min)	% A	% B	% C	Fluxo (mL/min)	Volume de injeção	Temperatura da coluna
1,00	80	5	15	0,15	20 µL	25 °C
15,00	60	25	15	0,15		
16,00	5	5	90	0,25		
20,10	5	5	90	0,25		
26,00	5	5	90	0,15		
27,00	15	5	15	0,15		
35,00	15	5	15	0,15		

4.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO TESTADOS

A Tabela 3 apresenta um resumo dos testes realizados para o desenvolvimento da metodologia de sulfonamidas em leite UHT.

Tabela 4: Técnicas de extração empregadas nos 8 experimentos

Experimento	Solvente de extração	Sal adicionado	EFS
1	ACN com 0,1 % ác. oxálico	_____	_____
2	ACN com 0,1 % FOA	_____	_____
3	ACN com 0,1 % ác. oxálico	_____	Oasis®
4	ACN com 0,1 % FOA	_____	Oasis®
5	ACN com 0,1 % FOA	0,2 mg de MgSO ₄ + 0,05 mg de NaOAc	_____
6	ACN com 0,1 % FOA	0,2 g de MgSO ₄ + 0,1 g de NaOAc	_____
7	ACN com 0,1 % FOA	0,2 g de MgSO ₄ + 0,1 g de NaOAc	_____
8	ACN com 0,1 % FOA	0,1 g de MgSO ₄ + 0,05 g de NaOAc	_____

Diversos testes foram realizados até a obtenção do melhor resultado para as recuperações de acordo com a faixa aceitável de 70 a 120 % e para o desvio padrão relativo (DPR) em condições de repetibilidade de 18 %, estabelecidos para concentrações de 100 µg kg⁻¹, especificado pelo *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2009).

As recuperações obtidas das substâncias em cada metodologia testada encontram-se na Tabela 4.

4.2.1 Extração líquido-líquido

O teste 1 que somente utilizou a acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido oxálico para extrair as SA do leite UHT obteve um resultado de recuperação de 46,10 a 95,40 % e desvio padrão relativo de 1,54 a 40,90 % para os analitos. Somente as substâncias SMT e DAP que ficaram abaixo da faixa aceitável estabelecida pelo *Codex Alimentarius*, mas os desvios padrão relativo obtido para as substâncias foram acima do valor especificado.

Visando um aumento da recuperação foi realizado outro experimento substituindo o ácido oxálico pelo ácido fórmico. As recuperações obtidas no teste 2 foram de 77,10 a 99,52 % e desvios padrão relativo de 12,75 a 25,20 %.

A extração com acetonitrila acidificada com ácido fórmico introduzido a partir do teste 2 demonstrou melhores valores de recuperação e do desvio padrão relativo quando comparado aos valores para acetonitrila acidificada com o ácido oxálico.

4.2.2 Extração por fase sólida (EFS)

O experimento 3 com purificação por EFS (Tabela 3) realizado em meio ácido utilizando acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido oxálico demonstrou baixa recuperação para todas as SA (7,47 a 35,88 %) e altos valores de desvio padrão relativo que foram de 22,45 a 74,46 %.

Visando um aumento da recuperação foi realizado outro experimento substituindo o ácido oxálico pelo ácido fórmico. As recuperações obtidas no teste 4 foram de 24,59 a 46,10 % e os valores de desvio padrão relativo foram de 13,16 a 31,55 %.

A extração com acetonitrila acidificada com ácido fórmico demonstrou valores melhores de recuperação, mas continuaram abaixo da faixa aceitável estabelecida pelo *Codex Alimentarius*.

Os testes realizados por EFS foram baseados no método de Tetraciclinas em leite (SPISSO et al, 2009) devido as semelhanças físico-químicas com as sulfonamidas, e os resultados obtidos de recuperação foram abaixo do limite aceitável, talvez fosse necessário a realização de outros testes de eluição dos analitos nos cartuchos.

4.2.3 Método de QuEChERS

A partir da introdução dos sais sulfato de magnésio e acetato de sódio no experimento 5 conseguiu-se uma recuperação adequada para todos os analitos avaliados (acima de 70 %) com um baixo desvio padrão relativo ($\leq 6,63\%$).

Comparando-se os experimentos 6 e 7, observou-se que o volume total de acetonitrila acidificada poderia ser adicionado de uma vez só. Também foi observado que ao aumentar à quantidade de sal as recuperações aumentavam (Figura 8), porém a maior quantidade (0,2 g para o sulfato de magnésio e 0,1 g para acetato de sódio) resultou em valores maiores para o desvio padrão relativo (testes 6 e 7) como pode ser observado na Figura 9.

Figura 8 - Recuperação das sulfonamidas no método QuEChERS.

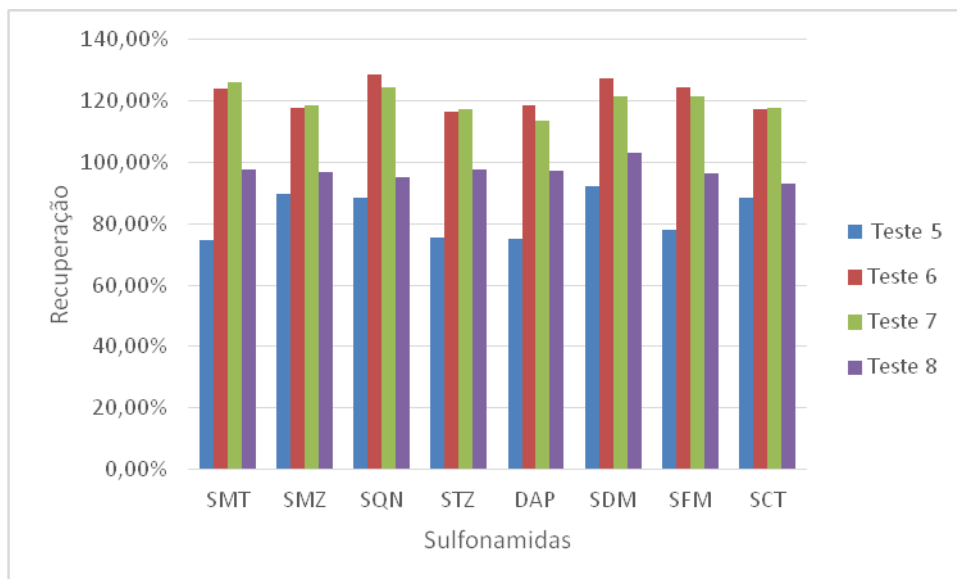
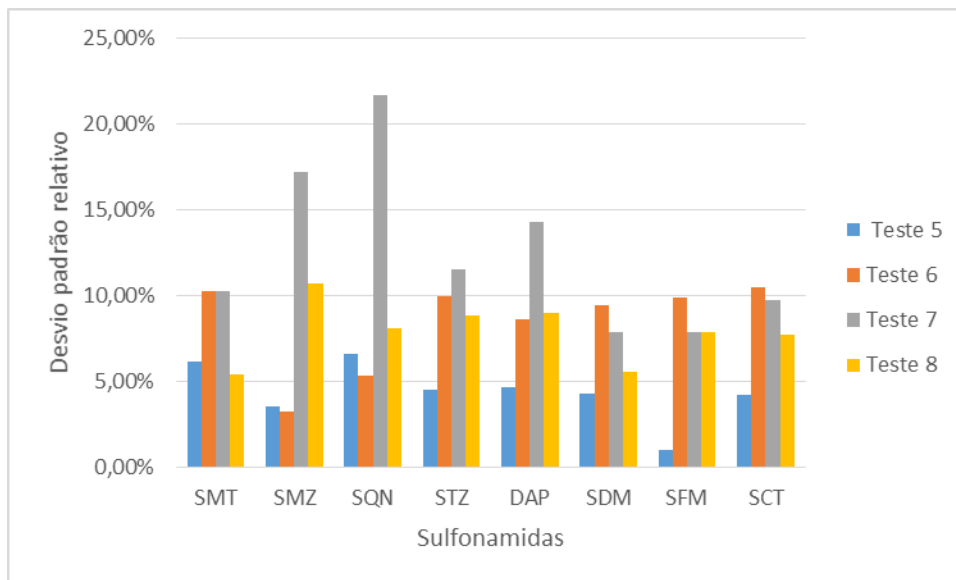


Figura 9 - Desvio padrão relativo das sulfonamidas no método QuEChERS.



Os valores de recuperação para o teste 5 foram de 74,62 % a 92,06 % e DPR de 1,01 a 6,63 %. O teste 6 apresentou valores para o DPR de 3,26 a 10,24 % e recuperação de 116,52 a 128,55 %; Para o teste 7 os valores de DPR foram de 7,88 a 21,67 % e de recuperação de 113,76 a 126,24 %, ultrapassando o limite aceitável de 120 %.

O teste 8 demonstrou valores de recuperação de 92,95 a 103,03 % (Figura 8), dentro da faixa aceitável e DPR de 5,42 a 10,75 %.

Alaburda e colaboradores (2007) desenvolveram um método para análise de sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina) em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência, obtendo valores de recuperação 63,2, 91,2 e 63,2 %, respectivamente e de DPR entre 4,4 e 6,6 %. Estes valores encontrados por Alaburda e colaboradores (2007) foram menores do que os encontrados neste estudo para as mesmas substâncias (97,69 % para o sulfatiazol, 96,29 % para a sulfametazina e 103,03% para a sulfadimetoxina).

Brondi e colaboradores (2013) ao desenvolver o método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite de búfalo obteve valores médios de recuperação que variaram de 83 a 112 %, com valor máximo de DPR de 17 %.

A partir dos resultados obtidos o experimento 8 foi selecionado para avaliação das 20 amostras de leite integral UHT, pois todas as sulfonamidas apresentaram resultados de recuperações dentro da faixa aceitável especificado pelo *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2009).

Tabela 5: Porcentagem de recuperação (R) média global e desvio padrão relativo (DPR) global das sulfonamidas em cada teste.

	Teste 1		Teste 2		Teste 3		Teste 4		Teste 5		Teste 6		Teste 7		Teste 8	
SA	R Média global (%)	DPR global (%)	R Média global (%)	DPR global (%)	R Média global (%)	DPR global (%)	R Média global (%)	DPR global (%)	R Média global (%)	DPR global (%)	R Média global (%)	CV global (%)	R Média global (%)	DPR global (%)	R Média global (%)	DPR global (%)
SMT	46,10	15,50	92,42	22,47	31,74	43,15	46,10	13,16	74,62	6,16	124,20	10,24	126,24	10,24	97,72	5,42
SMZ	70,23	16,79	92,42	22,47	28,82	22,45	46,10	13,16	89,69	3,57	117,71	3,26	118,82	17,19	97,02	10,75
SQN	88,99	26,16	94,52	12,75	25,15	26,73	45,79	22,58	88,44	6,63	128,55	5,35	124,29	21,67	95,14	8,12
STZ	9,4	1,54	77,85	15,05	26,68	37,57	41,36	26,97	75,58	4,54	116,52	9,99	117,19	11,54	97,69	8,88
DAP	50,14	40,90	81,61	25,20	7,47	45,04	24,59	31,55	75,19	4,68	118,83	8,61	113,76	14,33	97,14	9,00
SDM	82,30	30,49	82,30	30,49	48,28	14,99	90,97	6,61	92,06	4,29	127,26	9,44	121,48	7,88	103,03	5,57
SFM	86,22	16,68	86,22	16,68	44,84	22,79	86,22	16,68	77,85	1,01	124,67	9,92	121,48	7,88	96,29	7,90
SCT	83,36	19,46	83,36	16,46	44,31	16,6	81,32	3,82	88,31	4,22	117,48	10,48	117,83	9,76	92,95	7,72

4.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os valores de Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) foram estimados a partir dos dados das ACNC analisadas nos ensaios realizados do teste 8 e das amostras de leite UHT.

LOD é definido como a menor concentração ou massa de um analito que pode ser detectada com uma segurança aceitável, apesar de não quantificada com precisão aceitável (Food and Drug Administration, 2012). Os LOD do método foram calculados considerando-se a razão sinal/ruído ≥ 3 para a transição de confirmação, empregando o software Analyst®, e os valores obtidos estão na Tabela 5.

LOQ é definido como a menor concentração ou massa de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (Food and Drug Administration, 2012). Os LOQ do método foram calculados considerando-se a razão sinal/ruído ≥ 10 para a transição de confirmação, empregando o software Analyst® e os valores obtidos estão na Tabela 5.

Tabela 6: LOD e LOQ estimados para o método analítico.

Analito	LOD (ng Kg⁻¹)	LOQ (ng Kg⁻¹)
Sulfametoxazol	5	17
Sulfametazina	11	36
Sulfaquinoxalina	42	140
Sulfatiazol	12	41
Dapsona	8	28
Sulfadimetoxina	6	20
Sulfamerazina	6	19
Sulfacetamida	46	153

4.4 AMOSTRAS DE LEITE UHT ANALISADAS

4.4.1 Avaliação das amostras ACBR e ACC

As amostras controle branco de reagentes (ACBR) e controle conforme (ACC) foram analisadas com o objetivo de verificar se há algum tipo de contaminação nos reagentes e insumos e na amostra branca de leite utilizada para realização do ensaio. As injeções das amostras controle conforme (ACC) (Figura 10) e controle branco de reagentes (ACBR) (Figura 11) forneceram cromatogramas sem picos nas

transições e respectivas regiões de eluição dos analitos alvo, sendo assim consideradas em conformidade na análise, como pode ser observado nas Figuras 10 (para ACC) e 11 (para ACBR).

Figura 10 - Cromatograma da amostra controle conforme (ACC).

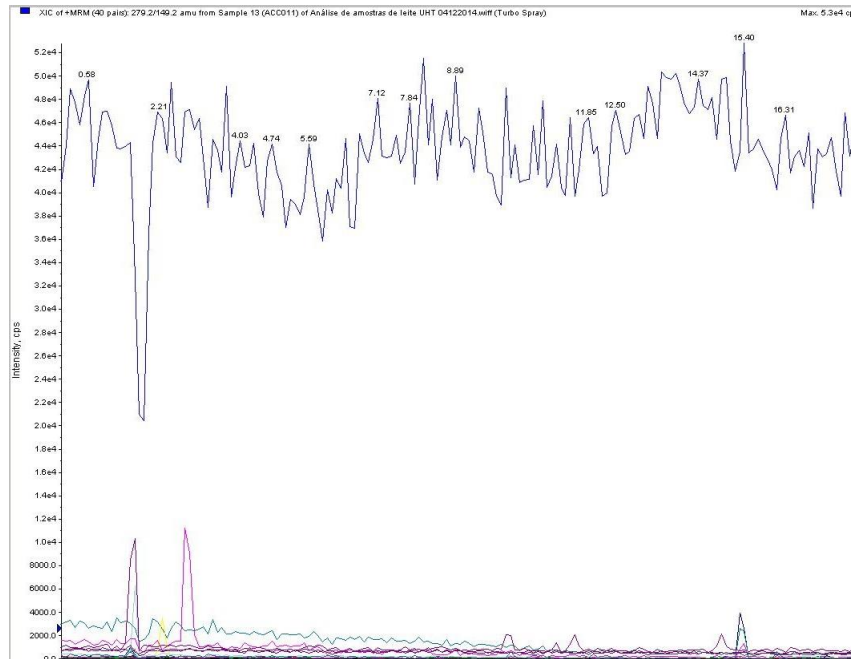
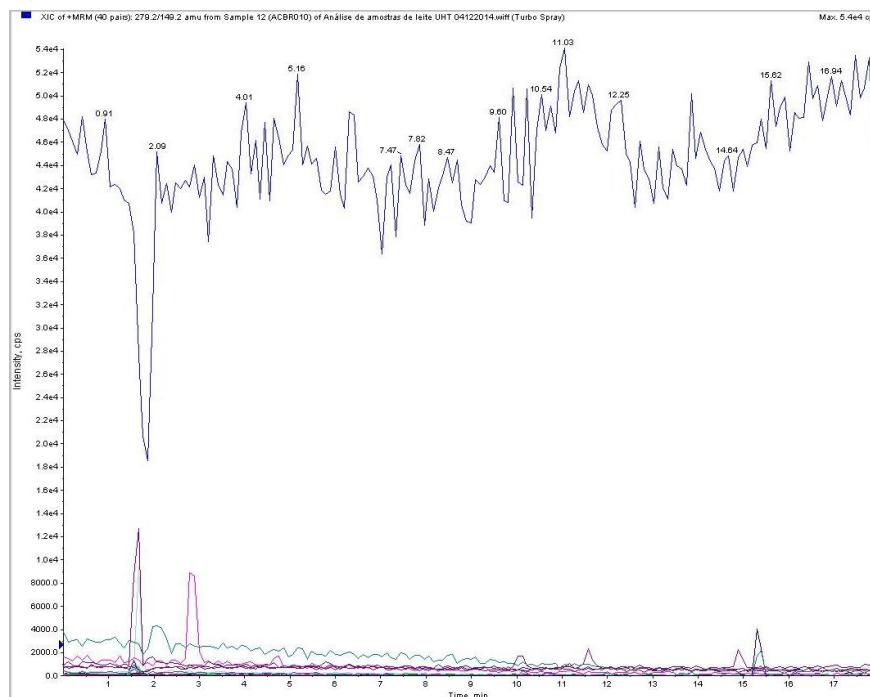


Figura 11 - Cromatograma da amostra controle branco de reagentes (ACBR).



4.4.2 Avaliação das recuperações dos analitos

A recuperação foi calculada a partir da fortificação dos analitos na matriz leite, utilizando as amostras ACNC e ACNCFF. A Tabela 6 mostra os resultados de recuperação obtidos pelos analitos. Como podem ser visualizados, todos os analitos foram recuperados durante o processo analítico. Sulfatiazol, dapsona e sulfacetamida obtiveram resultados de aproximadamente 70 % e as suas recuperações estão de acordo com os valores aceitáveis do DPR.

Tabela 7: Recuperação dos analitos em leite UHT integral.

Sulfonamidas	Recuperação global (%)	DPR global (%)
Sulfametoxazol	76	10
Sulfametazina	75	18
Sulfaquinoxalina	70	18
Sulfatiazol	68	18
Dapsona	67	8
Sulfadimetoxina	73	12
Sulfamerazina	77	13
Sulfacetamida	68	6

4.5 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

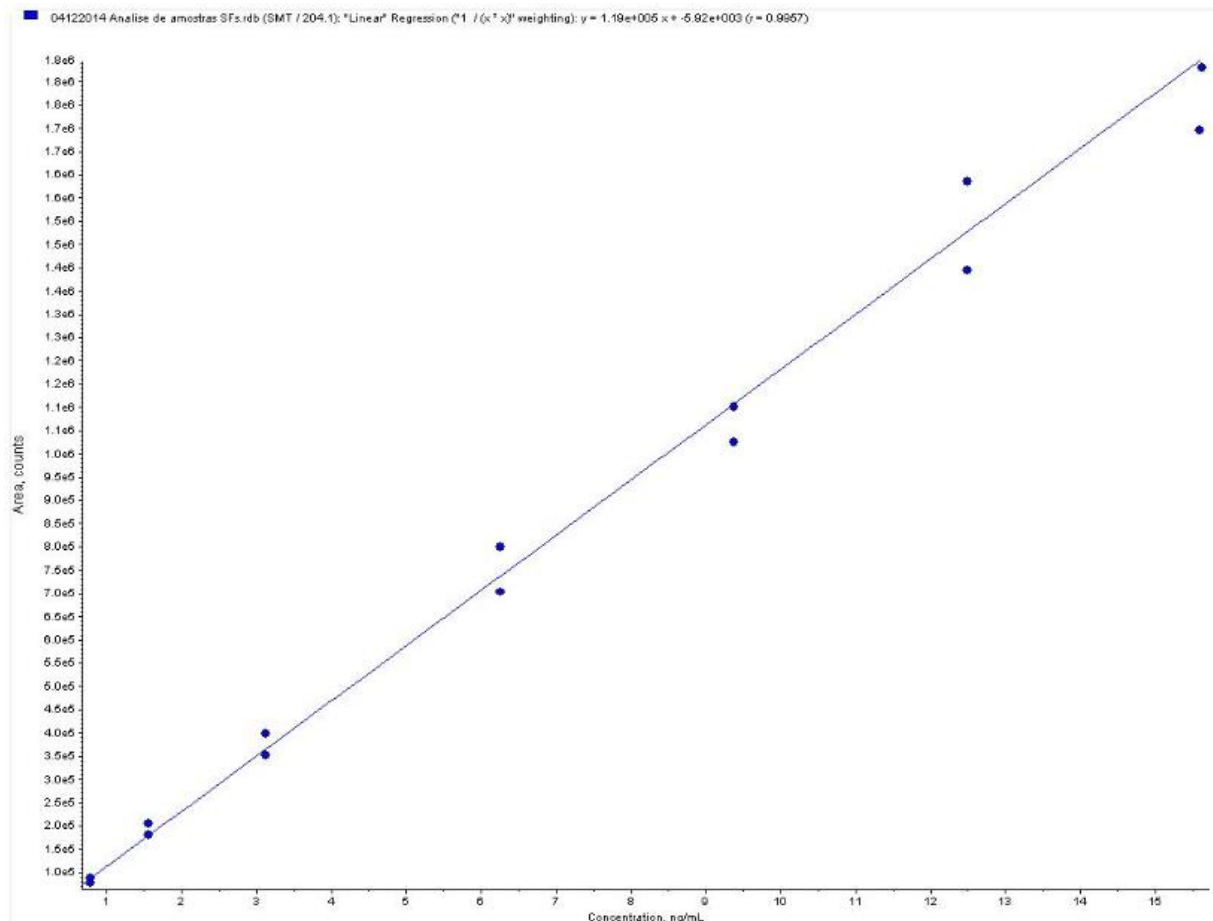
Curvas de calibração de cada analito na matriz foram construídas com o objetivo de quantificar as substâncias nas amostras. A interpolação na curva foi obtida para cada analito pelo método dos mínimos quadrados ponderados, com peso $1/x^2$, empregando o software Analyst[®]. Todas as SA apresentaram uma boa linearidade, pois obtiveram coeficientes de regressão maiores do que 0,99 como podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 8: Linearidade das sulfonamidas na matriz.

Sulfonamidas	Coefficiente de Regressão
SMT	0,9957
SMZ	0,9957
SQN	0,9959
STZ	0,9978
DAP	0,9976
SDM	0,9966
SFM	0,9931
SCT	0,9941

A curva de calibração do sulfametoxazol é apresentada na Figura 12, e apresenta uma boa linearidade.

Figura 12 - Curva de calibração do sulfametoxazol na matriz leite.



4.6 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE UHT COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

A Tabela 8 contém as amostras analisadas e suas respectivas procedências. Não foi possível detectar resíduos das sulfonamidas em nenhuma amostra de leite, pois não apresentaram concentrações superiores aos limites de detecção estimados no desenvolvimento da metodologia. Os resultados das análises das amostras de leite integral UHT comercializados no município do Rio de Janeiro, encontram-se em conformidade considerando o LOD estimado no método desenvolvido.

Nas análises realizadas pelo PNCRC/Animal do MAPA não foram detectados resíduos de sulfonamidas em concentrações superiores aos LMR em amostras de leite UHT analisadas no período de 2006 a 2012 (BRASIL, 2007, 2009, 2011, 2012, 2013). No relatório 2005/2006 da ANVISA houve a detecção de sulfatiazol em 3,87 %, sulfametazina em 4,52 % e sulfadimetoxina em 3,01 % do total de amostras de leite UHT (BRASIL, 2013). Macedo (2012) ao testar os métodos EFS e QuEChERS não detectou resíduos de sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina) em nenhuma amostra de leite UHT comercializada no município de São Carlos.

Tabela 9: Resultados das amostras de leites UHT avaliados quanto a presença de sulfonamidas.

Código Laboratório	Procedência	Resultado da análise SA
022/2014	Arroio do Meio-RS	< LOD
023/2014	Barra Mansa-RJ	< LOD
024/2014	Passo Fundo-RS	< LOD
025/2014	Teutônia-RS	< LOD
026/2014	Ponte Nova-MG	< LOD
027/2014	Concórdia-SC	< LOD
028/2014	Patos de Minas-MG	< LOD
029/2014	Zona Rural Maravilha-SC	< LOD
030/2014	Barra Mansa-RJ	< LOD
031/2014	Barra Mansa-RJ	< LOD
032/2014	Jaborandi-BA	< LOD
033/2014	Amparo-SP	< LOD
034/2014	Itaperuna-RJ	< LOD
031/2013	Santa Helena de Goiás-GO	< LOD
033/2013	São Paulo-SP	< LOD
035/2013	Governador Valadares-MG	< LOD
034/2013	São Paulo-SP	< LOD
044/2013	Itaperuna-RJ	< LOD
032/2013	Fazenda Vila Nova-RS	< LOD
042/2013	Santa Maria-RS	< LOD

5 CONCLUSÃO

A conscientização ambiental, a exigência de técnicas mais sensíveis, com menor tempo de análise e menor gasto com solventes, tem conduzido os laboratórios a desenvolverem metodologias analíticas que se adequem a essa realidade, com novas propostas de extração, como é o caso do método QuEChERS, o qual é relativamente simples e rápido quando comparado a outros métodos aplicados em rotina, como a extração em fase sólida.

Nesse estudo o *clean-up* ou limpeza pelo método de extração líquido-líquido foi feito através da comparação da adição de dois solventes orgânicos, ácido oxálico e ácido fórmico, à acetonitrila. O ácido fórmico demonstrou ser um solvente mais eficaz na eliminação de interferentes do que o ácido oxálico nos testes desenvolvidos, isso pode ser explicado pelo valor do pka do ácido fórmico (3,75) ser menor do que o pka do ácido oxálico (4,2), logo o ácido fórmico sendo mais forte irá protonar os interferentes, tornando a limpeza mais eficiente.

O método EFS desenvolvido não possibilitou a análise das SA dentro da faixa estabelecida pelo *codex alimentarius*, pois todas as SA apresentaram recuperação abaixo de 70 %, e valores acima de 14 % para o desvio padrão relativo, tanto na extração com ácido oxálico quanto na extração com ácido fórmico.

A partir da introdução dos sais sulfato de magnésio e acetato de sódio todas as sulfonamidas ficaram dentro da faixa aceitável pelo *codex alimentarius*. O teste 6 e 7 foram descartados por ultrapassarem os valores de 120 % para as substâncias: sulfametazina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina. O teste cinco apresentou valores que variaram de 70 % a 90%, aproximadamente, já o teste oito apresentou valores de recuperação em torno de 100 % para todas as substâncias, por isso o teste oito foi selecionado para análise das amostras.

O *clean-up* das amostras mostrou-se satisfatório, uma vez que não foram observadas interferências na análise cromatográfica. Apesar de constar na literatura diversos métodos que descrevam a utilização de EFS para análise de sulfonamidas em leite, esse método de extração não comprovou sua eficiência nesse estudo.

Na análise das amostras de leite integral UHT de diferentes marcas, obtidas do comércio do Rio de Janeiro, não houve detecção das sulfonamidas estudadas, considerando o limite de detecção do método analítico.

O presente estudo mostrou-se satisfatório dentro das avaliações realizadas para recuperação, desvio padrão relativo, linearidade, limite de quantificação e limite de detecção. Logo, após a validação da metodologia analítica desenvolvida, poderá ser implementado nas análises de rotina do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários.

6 REFERÊNCIAS

ALABURDA, J.; Ruvieri, V.; Luzia, S.; ALMEIDA, A.,P.; Tiglia, P.; Sabino, M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.42, n.11, p.1587-1592, nov, 2007.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**. vol. 40, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>.(relatorio_02_03.pdf PAMVET). Acesso em :08/08/2014. Brasília, Nov. de 2003.

BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3709.pdf, acesso em 07/08/2014).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 53, de 02 de outubro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico Mercosul - Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 03 out. 2012. Seção 1, p. 47, nº192.

BRASIL. Instrução Normativa nº12, de 10 de abril de 2001. Adota o Regulamento Técnico Mercosul Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 abr. 2001. Seção 1, p. 10.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20/9/1990. Seção 1, p. 18055.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27/01/1999a. Seção 1. p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 09, de 10 de abril de 2008. Dispõe sobre os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2007, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007. **Diário Oficial da União**. Brasília, 17 abr. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 15, de 25 de maio de 2009. Publica os resultados do monitoramento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 mai. 2009. Seção 1, p.28

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf. Acesso em 07/08/2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 jul. 1952, Seção 1, p. 10785.

BRASIL. 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**. Brasília, 22 Dez. 1999b. Seção 1, p. 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 07, de 27 de março de 2013: Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2012. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2012. **Diário Oficial da União**. Brasília, 03 abr. 2013. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 07, de 04 de abril de 2012: Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2011. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 abr. 2012. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 06, de 25 de fevereiro de 2011: Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2010. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2010. **Diário Oficial da União**. Brasília, 28 fev. 2011. Página 4. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 06, de 16 de março de 2010: Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2009. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2009. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 mar. 2010. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 08, de 30 de março de 2007: Promove a publicação dos resultados do PNCR/Animal referentes ao exercício do ano de 2006. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. 2006. Diário Oficial da União. Brasília, 10 abr. 2007, Seção 1, Página 1.

BRINKMANN, S. Leite e modernidade: ideologia e políticas de alimentação na era Vargas. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, vol.21, no.1 Rio de Janeiro, Jan, 2014.

BRONDI, S. H. G.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; CAMARGO, L. A.; MAJARON, R. F. Desenvolvimento e validação do método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. **Rev. Quim. Nova**, vol. 36, nº 1, p. 153-158, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance program associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71-2009. 38p.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, vol. 40, n. 2, p. 209-218, abr./jun., 2004.

FERREIRA, R. G.; SPISSO, B. F.; HORA, I. M. C.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; COSTA, R. P.; CARLOS, B. S. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Rev. Segurança alimentar e nutricional**. vol. 19, nº 2 p. 30-49 19, Campinas, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program**. Office of Foods. Department of Health & Human Services. Version 1.0. 28 February 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Rev. Quim. Nova**, vol. 33, no. 3, p. 667-679, 2010.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Rev. Scientia Chromatographica**. vol.2, nº1, p. 13-25, Campinas, 2010.

JOCE. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias** REGULAMENTO (CEE) No 675/92 DA COMISSÃO de 18 de Março de 1992.

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios>, acesso em 10/08/2014, Brasília, 2014b.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano mais pecuária.**

Disponível em:

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/Publicacao_v2.pdf, acesso em 07/08/2014. 1ª edição, Brasília, 2014a.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, vol.18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. Resolução GMC (Grupo Mercado Comum) nº54, de 29 setembro de 2000 nº 54/2000. Regulamento Técnico Mercosul Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Disponível em: <http://www.mercosul.gov.br/normativa/resolucao/2000/mercosul-gmc-res-no-54-00>. Acesso em: 12/08/2014

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Rev. Quim. Nova**, vol. 32, nº. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Rev. Quim. Nova**, vol. 36, Nº. 5, p. 697-710, 2013.

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. **Rev. Quim. Nova**, vol. 24, No. 1, p. 68-76, 2001.

ROSENFELD, Suely. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2009.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. Y.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, vol. 65 , p.725–759, maio-2006.

SPISSO, B. F.; ARAÚJO JR, M. A. G.; MONTEIRO, M. A.; LIMA, A. M. B.; PEREIRA, M. U.; LUIZ, R. A.; NÓBREGA, A. W. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Anal. Chim. Acta*, v. 656, n.1-2, p. 72-84, 2009.

STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growthpromoting agents in food-producing animals—a review **J.Chromatogr. A**. vol.1067, p. 15–53, 2005.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão nº 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao dispositivo na Diretiva

96/23/CE do Conselho relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, Bruxelas, n. L 221, p. 8-36, 17 agosto 2002.