

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL - MG

SIMONE CAETANI MACHADO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIMA EM
MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO E EM CARNE DE FRANGO

Alfenas/MG

2011

SIMONE CAETANI MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIMA EM
MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO E EM CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.
Orientadora: Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara.

Alfenas/MG

2011

SIMONE CAETANI MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIMA EM
MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO E EM CARNE DE FRANGO**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfnas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Aprovada em: ____ / ____ / _____

Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara

Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfnas

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Assinatura: _____

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfnas

Dedico a Deus, à minha mãe e irmã, por estarem sempre ao meu lado na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e suprir em todas as minhas necessidades.

A minha mãe, Antonia, por todo amor dedicado à nossa família, por acreditar em meus sonhos e estar sempre ao meu lado, e minha irmã, Vanessa, pelo amor e confiança. Ao meu companheiro, Marco Júnior, por tornar possível a busca pelos meus ideais. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida.

A Prof^a. Dr^a. Isarita, pela paciência, confiança e principalmente pela orientação no desenvolvimento deste estudo. Sou hoje uma profissional um pouco melhor, graças a você. Seus ensinamentos e exemplo estarão sempre presentes em minha vida.

A Paty, pela paciência e prontidão sempre que precisei tirar alguma dúvida ou resolver algum problema. A Márcia e a Andressa, por estarem sempre prontas a me ajudar.

Aos professores do Grupo de Pesquisa: Análises de toxicantes e fármacos, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores membros da banca examinadora, Dr. Félix Reyes e Dr. Eduardo Figueiredo, extensivo aos suplentes, pelas correções, que enriqueceram meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Unifal, pela oportunidade e pela concessão da bolsa PIB-PÓS por um ano. A Capes pela concessão da bolsa por um ano, ao CNPq e Fapemig pelo fomento no desenvolvimento do projeto.

A Mariane, Marcela, Gabriela e Evandro, pela amizade e por toda a contribuição que deram a este trabalho.

E, finalmente, aos meus amigos. Sabe-se que o maior perigo que se corre em selecionar pessoas para listar no agradecimento não é decidir quem incluir, mas quem não mencionar. Como eu não pretendo deixar ninguém de fora, a TODOS os meus amigos, que contribuíram com sua amizade, companheirismo e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os
capacitados, capacita os escolhidos”

Albert Einstein

RESUMO GERAL

Medicamentos veterinários são utilizados para promover a saúde animal, propiciar ganhos econômicos e aumentar a produtividade da indústria de alimentos. Porém, a ausência de um programa eficiente para fiscalização e o uso de forma inadequada ou excessiva, desses medicamentos, representam uma ameaça ao consumidor, por contribuírem com a presença de resíduos em tecidos animais destinados à produção de alimentos. Esses resíduos, à longo prazo, contribuem para o aparecimento de resistência por parte dos microorganismos a antimicrobianos utilizados na prática clínica humana, além de possibilitar o desenvolvimento de reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis. Sendo a segurança alimentar um tema cada vez mais relevante, devido à crescente busca por uma melhor qualidade de vida, e à conscientização dos consumidores quanto ao direito de adquirir produtos seguros à saúde, o objetivo desse estudo foi desenvolver método para a análise simultânea de medicamentos veterinários, que contenham em sua formulação os antimicrobianos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP), visando seu emprego no controle de qualidade. Além disso, constituiu escopo desse trabalho desenvolver método para determinação das sulfonamidas: sulfadiazina (SDZ), sulfametoxipiridazina (SPZ) e SMX em carne de frango, para ser empregado no controle e fiscalização de alimentos de origem animal, pelos órgãos competentes. Para o método de controle de qualidade não houve a necessidade do desenvolvimento de um preparo de amostras, sendo suficiente a realização de diluições para a quantificação dos analitos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com coluna Thermo BDS Hypersil[®] C₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) e detecção em ultravioleta (UV) a 213 nm. O método apresentou linearidade no intervalo de 5 a 70 µg mL⁻¹ para SMX e de 1 a 30 µg mL⁻¹ para TMP ($r^2 \geq 0,99$, para ambos compostos). O desvio padrão relativo foi $\leq 5\%$, e o teste de adição de padrão indicou exatidão. Assim, o método proposto apresentou grande potencial para análise simultânea dos fármacos avaliados e representa uma simples e rápida alternativa para o controle de qualidade de medicamentos veterinários. Já para a análise de sulfonamidas em carne de frango, foi desenvolvido método, constituído pela técnica QuEChERS modificado e posterior detecção/ quantificação dos analitos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC- DAD), empregando

coluna Lichrospher 60 RP-Select B (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) a 40°C, fase móvel constituída por tampão fosfato: acetonitrila (75:25, v/v), na vazão inicial de 0,5 mL min^{-1} , aumentando para 1,2 mL min^{-1} . Os analitos foram detectados a 265 nm. O método apresentou seletividade, assim como linearidade na faixa de 30 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a SDZ e de 25 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o SMX e SPZ. A precisão, avaliada pela repetibilidade e pela precisão intermediária, apresentou desvio padrão relativo entre 1,4 a 14%, para os níveis baixo, médio e alto, do intervalo linear. A detectabilidade do método foi satisfatória, uma vez que os limites de detecção e de quantificação obtidos foram 10 e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, e o limite máximo de resíduo, preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) é igual a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O procedimento de preparo de amostra QuEChERS é simples, rápido e foi empregado com sucesso na matriz estudada. Os resultados obtidos sugerem que o método desenvolvido é útil para o monitoramento de resíduos de SMX, SPZ e SDZ em amostras de peito de frango, uma vez que seu desempenho atende a todos os requisitos e critérios aceitáveis, de acordo com órgãos regulatórios como a Comunidade Européia e o MAPA, para a avaliação de resíduos em alimentos, visando à segurança do consumidor.

Palavras-chave: Sulfonamidas. Trimetoprima. Drogas veterinárias. Resíduos. Carne. Aves Domésticas. Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

ABSTRACT

Veterinary drugs were used worldwide to promote animal health, provide economic gains and increased productivity of the foodstuffs industry of animal origin. However, the absence of an effective monitoring program and the use of excessive or inappropriate these drugs present a threat to consumers, because they contribute with the presence of residues in animal tissues destined for food production. These residues, in long term, contribute to the appearance of microbial resistance by antimicrobials used in human clinical practice, beyond to enable the development of allergic reactions in hypersensitive individuals. Being the food safety an issue increasingly relevant due to the increasing search for a better quality of life, and the awareness consumers about the right to purchase insurance products to health, the aim of this study was to develop a technique for quality control simultaneous analysis of veterinary drugs containing the antimicrobial agents sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) in their formulations, beyond development of a method for sulfonamides analysis, sulphadiazine (SDZ), sulphamethoxy pyridazine (SPZ) e sulphamethoxazole (SMX), in chicken breast, which could be used in a routine laboratory. For the method of quality control there was no need to develop a sample preparation, being sufficient the achievement of dilutions for quantification of analytes by high performance liquid chromatography, with Thermo BDS Hypersil[®] C₁₈ column (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) and ultraviolet detection (UV). The quality control method demonstrated linearity in the range of 5 to 70 μg mL⁻¹ for SMX and 1 to 30 μg mL⁻¹ for TMP ($r^2 \geq 0.99$ for both compounds). The relative standard deviation was $\leq 5\%$, and and test of standard addition indicated that the method was accurate. The proposed method shows great potential for simultaneous analysis of the drugs evaluated and represents a new alternative approach to quality control of veterinary medicines. For the analysis of sulfonamides in chicken breast, a method was developed, based on the technique QuEChERS modified using high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector and LiChrospher 60 RP - Select B[®] C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 μm) column at 40°C, mobile phase constituted by phosphate buffer: acetonitrile (75:25, v/v) at a initial flow rate of 0.5 mL min⁻¹, increased by 1.2 mL min⁻¹ (total run time of 20 min) and detection at 265 nm. The QuEChERS method is inexpensive, fast and easy, and the extraction of the analytes

of the matrix was successfully employed. In addition, the method presented linearity, in the range of 30 to 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for SDZ, and 25 to 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for SMX and SPZ. The precision, evaluated by repeatability and intermediate precision, presented relative standard deviation of 1.4 to 14% for low, medium and high levels of the linear range. The detectability of the method was satisfactory, since the limits of detection and quantitation obtained were 10 and 25 mg kg^{-1} , respectively, and the maximum residue limit recommended by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil is equal to 100 mg kg^{-1} . The procedure of sample preparation QuEChERS is simple, fast and has been successfully used in the matrix studied. The results suggest that the method developed is useful for monitoring residues of SMX, SDZ and SPZ in samples of chicken breast, since its performance meets all the requirements and criteria acceptable in accordance with regulatory guides, including the Community European and Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil, for the evaluation of residues in foods, aiming to consumer safety.

Keywords: Sulphonamides. Trimethoprim. Veterinary Drugs. Residues. Meat. Poultry. High Performance Liquid Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos fármacos: (A) trimetoprima, (B) sulfametoxazol, (C) sulfadiazina e (D) sulfametoxipiridazina	18
Figura 2 – Depleção teórica de resíduos de antimicrobianos em tecidos comestíveis de animais	21
Figura 3 – Comportamento anfotérico das sulfonamidas	26
Figura 4 – Representação estatística do limite de decisão e capacidade de detecção para substâncias com LMR estabelecido	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medicamentos veterinários, disponíveis no mercado brasileiro, contendo sulfametoxazol (SMX), sulfadiazina (SDZ), sulfametoxipiridazina (SPZ), trimetoprima (TMP) ou a associação deles	19
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de sulfonamidas e da trimetoprima	27
Tabela 3 – Técnicas de preparo de amostras e detecção de sulfonamidas e trimetoprima em diferentes matrizes	30

Machado, Simone Caetani.

Desenvolvimento de método para determinação simultânea de sulfonamidas e trimetoprima em medicamentos de uso veterinário e em carne de frango / Simone Caetani Machado. - Alfenas, 2011.
100 f. -

Orientador: Sakakibara, Isarita Martins
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas.
Bibliografia.

1. Sulfonamidas. 2. Trimetoprima. 3. Drogas veterinárias. 4. Resíduos. 5. Aves Domésticas. 6. Carne. 7. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. I. Sakakibara, Isarita Martins. II. Título.

CDD: 615.954

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIMA	17
2.1.1	Farmacocinética em animais	20
2.1.2	Utilização das SAs e TMP na avicultura	21
2.2	REGULAMENTAÇÃO	22
2.3	DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SAs E TMP EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL	24
2.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	31
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
4	RESULTADOS	37
4.1	ARTIGO I	38
4.2	ARTIGO II	62
5	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

Medicamentos veterinários são utilizados no mundo todo para promover a saúde animal, propiciar ganhos econômicos e aumento da produtividade da indústria de alimentos de origem animal. No Brasil, o mercado desses medicamentos é um dos maiores do mundo e encontra-se em franca expansão (ACAR; MOULIN, 2006; BRASIL, 1999).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), em 2009, a despesa com medicamentos veterinários na criação de ruminantes, suínos e aves foi de R\$ 1,5 bilhões, R\$ 431,2 milhões e R\$ 401,9 milhões, respectivamente. Ainda, segundo dados do SINDAN, o maior gasto foi com a classe dos antimicrobianos, sendo o valor relatado em 2009, de aproximadamente 633,4 milhões de reais (SINDAN, 2010).

De acordo com a Comunidade Européia, para que um medicamento veterinário possa ser utilizado, deve ser objeto de uma autorização de introdução no mercado emitida por uma autoridade competente. Para este efeito, deve ser apresentado um processo de pedido de autorização, contendo as informações e os documentos relativos aos resultados de testes e ensaios realizados com esse medicamento veterinário (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2009).

No Brasil, até então, não existe fiscalização e controle de qualidade de medicamentos de uso veterinário pelos órgãos oficiais competentes. Spisso, Nóbrega e Marques (2009) comentam que não há participação dos setores saúde e meio ambiente nas avaliações para fins de registro de produtos de uso veterinário, bem como de aditivos empregados na alimentação animal. Pode-se observar até o momento discrepâncias entre períodos de carência mencionados em bulas para produtos idênticos registrados no Brasil e na União Européia. Além disso, erros de administração desses medicamentos e o uso inadequado podem comprometer a oportunidade de negociação internacional (LE BOULAIRE; BAUDURET; ANDRE, 1997).

A segurança alimentar é um tema cada vez mais relevante, devido à crescente busca por uma melhor qualidade de vida e conscientização dos consumidores quanto ao direito de adquirir produtos seguros à saúde. O uso de substâncias em animais produtores de alimentos para o consumo humano requer

estudos de farmacocinética à depleção de resíduos, com o estabelecimento de limites máximos de resíduos, de forma que não constituam um risco à saúde humana. Além das substâncias utilizadas intencionalmente, outras advindas da contaminação ambiental ou contaminação das rações ingeridas por esses animais podem atingir o homem através da dieta (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

Resíduos podem estar presentes em concentrações mínimas, mas podem apresentar uma ameaça para a saúde dos consumidores. O uso de medicamentos veterinários de forma inapropriada ou excessiva pode resultar na presença de resíduos em tecidos animais destinados à produção de alimentos, que contribuem para a geração de efeitos à longo prazo, incluindo o aparecimento de resistência por parte dos microrganismos, tendo como consequência a redução da eficácia desses fármacos, tanto em animais como em humanos, além do desenvolvimento de reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis (CHIAOCHAN et al., 2010).

Para medicamento de uso veterinário, o Limite Máximo de Resíduos (LMR) é definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento, resultante do seu uso. É baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana considerando-se a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto. A IDA é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que provoque danos à saúde. Ela é expressa em mg kg^{-1} de peso corpóreo. A determinação da IDA é baseada nas informações toxicológicas disponíveis daquele composto na época da avaliação. Quando se estabelece um LMR, são levados em consideração os resíduos que ocorrem nos alimentos, assim como os provenientes do ambiente. No entanto, o LMR pode ser fundamentado em boas práticas no uso de medicamentos veterinários e nas metodologias analíticas disponíveis (JECFA, 2010).

A competência para estabelecer os LMRs em alimentos no Brasil, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). No caso de medicamentos veterinários esses limites nacionais ainda não foram definidos pelo setor saúde e, portanto, utilizam-se o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal, os níveis obtidos de referências internacionais (*Codex Alimentarius*), regionais (Mercosul e União Européia) e/ ou nacionais (Agência para o Controle de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América, FDA/ USA) (BRASIL, 1999).

A carne de frango, na refeição diária, está se tornando cada vez mais popular, não só no país como também em todo o mundo, isso devido à mudança de hábito de consumo, uma vez que hoje há preferência pela ingestão de proteínas nobres, de fácil digestão, carnes com baixo teor de gorduras compostas por ácidos graxos assimiláveis, além de ricas em vitaminas e magnésio. Além disso, é um produto de fácil aquisição por todas as camadas sociais pelo seu baixo custo (BOTTEZINI; CORSO; VEIT, 2002).

A carne de frango é produzida em escala industrial, em todo o mundo, inclusive no Brasil, que possui uma das maiores produções mundiais e, ainda com grande potencial de expansão (BOTTEZINI; CORSO; VEIT, 2002). A produção de carne de frango, apesar da crise mundial que acometeu o setor em 2009, foi maior do que em 2008, crescendo 0,39%, o que equivale a mais de 71 milhões de toneladas. Apesar de aparentemente baixo, o dado aponta um comportamento positivo, especialmente por referir-se a um período de recuperação internacional, após a crise iniciada em outubro de 2008. O Brasil encerrou o ano como terceiro maior produtor mundial, mesma colocação do ano anterior. De acordo com dados da União Brasileira de Avicultura (UBA), o país produziu 10,9 milhões de toneladas em 2009, o que representou 15,3% da produção mundial (UBA, 2010). Além disso, dados da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango mostram que 67% da produção brasileira de frango foram destinadas ao mercado brasileiro e 33% a exportações (ABEF, 2009/2010).

Esse alto consumo e produção avícola fez surgir, conseqüentemente, um grande número de doenças, devido à elevada densidade dos aviários, que pelas condições propícias oferecidas, podem ser chamados de incubadores de microrganismos. Para controlar estas enfermidades, optou-se pelo uso de antimicrobianos, causando uma grande revolução na medicina veterinária, pois além de destruir microrganismos, têm também como propriedade adicional, serem estimuladores do crescimento. As modernas tecnologias de produção avícola têm implicado numa dependência cada vez maior do uso destas substâncias químicas, durante as fases de produção (PALERMO, 2001).

De acordo com a Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009, é vedada a utilização de alguns medicamentos veterinários como aditivos zootécnicos, melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais, dos quais podemos citar os anfenicóis, tetraciclina, beta lactâmicos

(benzilpenicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (BRASIL, 2009).

Um levantamento feito pela Secretaria do Estado da Saúde do Paraná em 2005 mostra que sulfonamidas (SAs) associadas à trimetoprima (TMP) fazem parte do grupo de ativos mais utilizados como medicamentos preventivos na fase final do desenvolvimento do frango de corte e como medicamentos terapêuticos (PARANÁ, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIMA

As sulfonamidas (SAs) fazem parte de um importante grupo de antimicrobianos sintéticos que tem sido utilizado na terapia humana e veterinária, devido ao seu amplo espectro de atividade e baixo custo. As SAs foram os primeiros agentes a serem utilizados para o tratamento das infecções bacterianas (LOFFLIN, 2005). São bastante utilizadas na medicina veterinária e, quando não utilizadas de acordo com as boas práticas agrícolas, a presença de resíduos em produtos de consumo humano apresenta potencial risco toxicológico, desencadeando importantes reações adversas, inclusive as alérgicas (HOFF, 2008). Alguns compostos ainda são conhecidos por apresentarem potencial carcinogênico, além de aumentarem o risco de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, o que torna o uso terapêutico inadequado (MSAGATI; NINDI, 2004).

As SAs são análogos estruturais do ácido paraminobenzóico (PABA) e inibem de forma competitiva uma enzima bacteriana, a diidropteroato sintetase, que é responsável pela incorporação do PABA ao ácido diidrofólico (ácido fólico). Dessa forma, bloqueia a síntese do ácido diidrofólico e diminui a quantidade de ácido tetraidrofólico metabolicamente ativo (co-fator na síntese de purinas, timidina e DNA). Bactérias, ao contrário de células eucarióticas, não utilizam ácidos fólicos pré-formados e necessitam sintetizá-lo a partir do PABA. A ação das SAs é antagonizada pelo PABA e seus derivados (procaína e tetracaína) e pela presença de pus e detritos celulares (TAVARES, 1996). Dentre as principais SAs, destacam-se a sulfadiazina (SDZ), a sulfametoxipiridazina (SPZ) e o sulfametoxazol (SMX), cujas estruturas são apresentadas na Figura 1, juntamente com a trimetoprima (TMP).

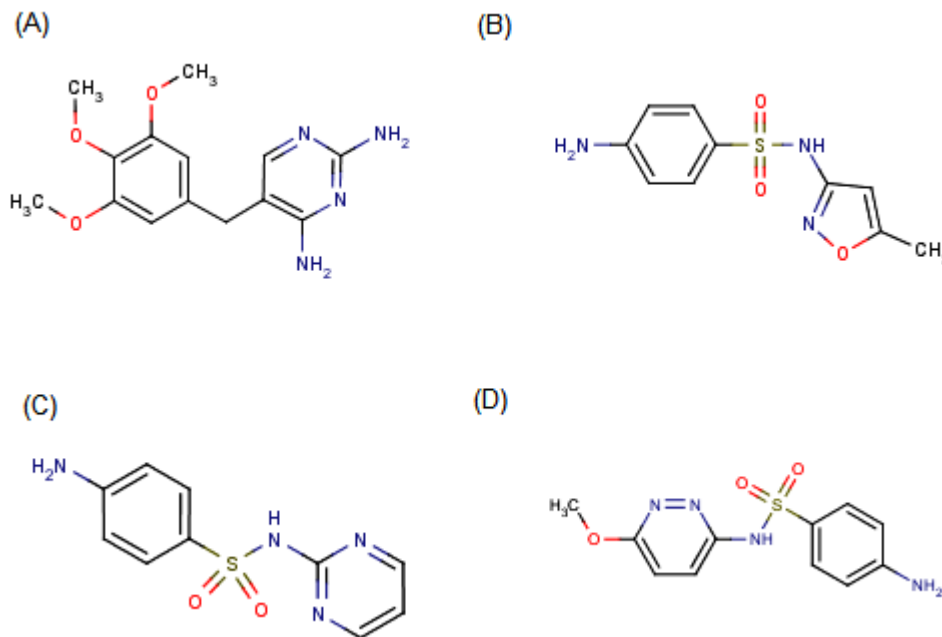


Figura 1- Estrutura química dos fármacos: (A) trimetoprima, (B) sulfametoxazol, (C) sulfadiazina e (D) sulfametoxipiridazina
 Fonte: COSTI; SICILIA; RUBIO (2010, p. 6251).

Normalmente, os medicamentos contendo SAs, consistem em associações, sendo uma das mais recorrentes aquela entre SMX e TMP, na relação 5:1, o que resulta em sinergismo do efeito antimicrobiano (CÓRDOVA et al., 2003, BISWAS et al., 2007) e amplia o espectro pela soma das ações. É mais difícil que ocorra surgimento de resistência bacteriana com o uso desta associação. O mecanismo de ação da associação é pelo bloqueio sequencial do ácido fólico dos microrganismos (VAN DUIJKEREN; VULTO; VAN MIERT, 1994).

A TMP, ou 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibenzil)-pirimidina (FIGURA 1), é uma base fraca lipofílica, com ação bacteriostática, estruturalmente relacionada com a pirimetamina. Une-se reversivelmente à enzima bacteriana diidrofolato redutase inibindo-a. Sua afinidade a essa enzima bacteriana é até 100.000 vezes maior que pela enzima humana equivalente. Exerce seu efeito num estágio, da biossíntese do folato, imediatamente posterior ao estágio em que atua o SMX, ocorrendo assim uma ação sinérgica entre ambos (TAVARES, 1996).

Na Tabela 1 são apresentados os medicamentos veterinários existentes no mercado brasileiro, contendo SMX, SDZ, SPZ, TMP ou a associação deles, segundo o Compêndio de Produtos Veterinários (SINDAN, 2010a).

Tabela 1 - Medicamentos veterinários, disponíveis no mercado brasileiro, contendo sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametoxipiridazina, trimetoprima ou a associação deles.

NOME COMERCIAL	FABRICANTE	FORMA FARMACÊUTICA	ATMs*
AFECTRIM	LABORATÓRIOS DUPRAT	suspensão oral	SMX, TMP
AVEREX	LABORATÓRIO VETERINÁRIO ORIENTE	pó via oral	SDZ
CONTROLBAC	FARMABASE SAÚDE ANIMAL	pó via oral	SMX, TMP
CURINFEC	PROVETS SIMÕES LABORATÓRIO	suspensão oral	SMX, TMP
DIASTIN	LABORATÓRIO CALBOS	sol. injetável	SDZ, TMP
DIATRIM	DES-FAR LABORATÓRIOS	solução oral	SDZ, TMP
ERIPRIM	DES-FAR LABORATÓRIOS	pó via oral	SPZ, TMP
FARTRIM	CEVA SAÚDE ANIMAL	sol. injetável	SMX, TMP
IBATRIM	LABORATÓRIO IBASA	sol. injetável	SDZ, TMP
IBATRIM	LABORATÓRIO IBASA	suspensão oral	SDZ, TMP
MASTICAL	LABORATÓRIO CALBOS	sol. uso local	SDZ
MASTISSULFA	PRODUTOS VETERINÁRIOS J. A.	sol. injetável	SMX, TMP
PRADOCOLO	LABORATÓRIO PRADO	pó via oral	SDZ
STOP ANTI- DIARRÉICO	LABORATÓRIO CALBOS	pó via oral	SMX, TMP
SULFAFORTE	INTERCHANGE VETERINÁRIA	pó via oral	SMX, TMP
SULFAMAX	VALLÉE S. A. PRODUTOS VETERINÁRIOS	sol. injetável	SDZ, TMP
SULFAPRIM	LABORATÓRIO BRAVET	comprimidos	SMX, TMP
SULTRIM	JOFADEL INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	suspensão oral	SMX, TMP
SULTRINJEX	LABORATÓRIO BIO-VET	sol. injetável	SMX, TMP
SUPERTRIN	EUROFARMA LABORATÓRIOS	sol. injetável	SDZ, TMP
SUPRONAL L	BAYER S. A.	creme de uso local	SDZ, TMP
TRIBACTAN	CLARION BIOCIEÊNCIAS	sol. injetável	SMX, TMP
TRIDOXIN 40	LEMA BIOLOGIC DO BRASIL	suspensão oral	SMX, TMP
TRIMETOX	FARMABASE SAÚDE ANIMAL	pó via oral	SMX, TMP
TRIMETOX	FARMABASE SAÚDE ANIMAL	solução oral	SMX, TMP
TRISSULFIN	OURO FINO SAÚDE ANIMAL	pó via oral	SMX, TMP
TRISSULFIN	OURO FINO SAÚDE ANIMAL	comprimidos	SMX, TMP
TRISSULFIN	OURO FINO SAÚDE ANIMAL	sol. injetável	SMX, TMP
TRISSULFIN	OURO FINO SAÚDE ANIMAL	suspensão oral	SMX, TMP
TST PREMIX	DES-FAR LABORATÓRIOS	pó via oral	SDZ, TMP
TST PREMIX S	DES-FAR LABORATÓRIOS	pó via oral	SDZ, TMP
TSTRIM	DES-FAR LABORATÓRIOS	sol. reconstituição	SMX, TMP

Fonte: SINDAN, 2010a.

*ATMs – antimicrobianos.

2.1.1 Farmacocinética em animais

Várias vias de administração, como a via oral, endovenosa, intramuscular e tópica são utilizadas para as SAs. Por via oral, são rapidamente absorvidas no trato gastrointestinal, exceto algumas de ação prolongada como a SPZ; de modo geral, 70 a 100 % da dose oral são absorvidos, todavia a absorção pode estar afetada em animais doentes (BAERT et al., 2003).

Dados farmacocinéticos têm sido descritos na literatura para algumas SAs em animais, porém são escassos os trabalhos realizados com TMP. Em estudo realizado por Baert et al. (2003) a biodisponibilidade média, por via oral, da SDZ e TMP em frangos de corte foi em média de 80%. Outros estudos têm reportado o tempo gasto para atingir a concentração plasmática máxima de outras SAs, como por exemplo, para a sulfaquinoxalina de 5,5 h (EL-SAYED; ABD EL-AZIZ; EL-KHOLY, 1995) e para a SDZ de 1,6 a 2,5 h (LÖSCHER et al., 1990).

As SAs se distribuem amplamente pelos tecidos e fluidos corporais, atravessam a barreira placentária e são excretadas no leite. Todavia, a distribuição das SAs individualmente depende de muitos fatores, como pKa, estado de ionização, a vascularidade do sítio de absorção, ligação às proteínas plasmáticas, entre outras. Em adição, a concentração de proteínas plasmáticas totais em mamíferos domésticos é similar àquela verificada em humanos (6,0 – 8,5 g dL⁻¹), mas esse valor varia entre 3,8 a 5,2 g dL⁻¹ em espécies galiformes devido à baixa concentração de albumina (LÖSCHER et al., 1990). Baert et al. (2003) relataram que, em frangos, a SDZ e TMP são rapidamente eliminadas do plasma, com meia-vida média de 1,61 h para a TMP e 3,2 h para SDZ. O volume aparente de distribuição (2,2 L kg⁻¹ para a TMP, e 0,43 L kg⁻¹ para a SDZ) indicou que a distribuição para os tecidos foi mais extensa para a TMP em relação à SDZ.

A biotransformação das SAs é hepática, por mecanismo de acetilação, formando N4-acetil derivados, que são metabólitos inativos. A conjugação pode ocorrer com ácido glicurônico e a excreção é renal, por filtração glomerular (VAN DUIJKEREN; VULTO; VAN MIERT, 1994).

Em relação a seu perfil farmacocinético, as SAs são usualmente classificadas como: a) sistêmicas de ação curta, com absorção e excreção rápida; meia-vida entre 4 – 7 horas (exemplos: sulfamerazina, sulfatiazol e sulfametizol); b)

sistêmicas de ação intermediária, meia-vida entre 10 – 12 horas (exemplos: SDZ e o SMX); c) sistêmicas de ação longa – maior porcentagem de absorção e excreção lenta, com meia-vida sérica de 35 – 40 horas (exemplo: SPZ). Como exceção, apresenta-se a sulfadoxina, de ação ultra-longa, cuja meia-vida é de 7 a 9 dias (PETERS et al., 2007).

Quando as SAs e TMP são utilizados com finalidade terapêutica em frangos de corte, deve-se respeitar o tempo de retirada (FIGURA 2), devido à presença de resíduos. Em muitos casos os produtores não obedecem ao intervalo de segurança estabelecido por lei. Esse intervalo é o período que deve ocorrer entre a última dose do medicamento e o abate, no caso do animal de corte. Esse tempo depende das características farmacocinéticas do medicamento (FURUSAWA; HANABUSA, 2002).

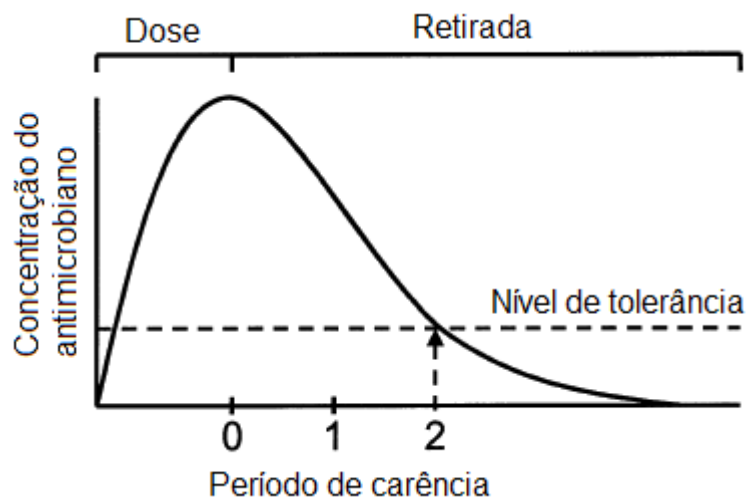


Figura 2 – Depleção teórica de resíduos de antimicrobianos em tecidos comestíveis de animais
Fonte: DONOGHUE (2003, p. 619).

2.1.2 Utilização das SAs e TMP na avicultura

SAs e TMP têm sido fármacos amplamente utilizados como agentes terapêuticos na avicultura, principalmente para o controle da coccidiose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas. A associação diaminopiridinas-SAs

(TMP e congêneres) tem sido aplicada para controle de infecções por *E. coli*, *Haemophilus paragallinarium*, cólera aviária (*Pasteurella multocida*) e salmoneloses (KUENZEL et al., 2004).

A via preferencial de administração de SAs e associações com diaminopiridinas em aves é a oral, através da água e da ração. Somente em casos de coriza e cólera aviária são ocasionalmente prescritos aplicação parenteral, paralelamente ao seu uso oral (SPENSER, 2004).

As SAs possuem um limite muito estreito entre o seu efeito terapêutico e tóxico, mesmo em níveis terapêuticos podem causar efeitos deletérios sobre o sistema imune, hematopoiético e reprodutivo das aves. A associação com diaminopiridinas (TMP) reduz riscos de toxicidade por diminuir a dose da sulfa. As diaminopiridinas são pouco tóxicas, mas podem causar, quando utilizadas em doses muito elevadas, deficiência de ácido fólico e hipercalcemia (FURUSAWA; HANABUSA, 2002).

As SAs são relativamente insolúveis em água e frente a um pH baixo tendem a se cristalizar e sedimentar. Devido a este fato, são difíceis de serem misturadas na ração, portanto, quando utilizadas dessa forma, é requerida atenção ao cálculo preciso da dose em função do consumo de água. Em frangos de corte é comum observar queda do ganho de peso e intoxicação em decorrência do consumo elevado de água ou ração. Em dias quentes ou em ambientes com temperatura acima de 27°C podem-se observar quadros tóxicos devido ao aumento do consumo de água (FURUSAWA; HANABUSA, 2002).

2.2 REGULAMENTAÇÃO

O controle oficial de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal é geralmente baseado no LMR e períodos de carência (intervalo de segurança), estabelecidos caso a caso. Em geral, os regulamentos referentes ao uso de medicamentos veterinários devem ser bem fundamentados e, ao escolher o tipo e dosagem de um medicamento, o risco à saúde humana devido à exposição a resíduos nos alimentos de origem animal deve ser considerado. Portanto, o desenvolvimento de método para a determinação de resíduos é necessário para

aqueles laboratórios que pretendem conseguir aprovação de medicamentos para uso em animais produtores de alimentos. Problemas referentes à presença de resíduos são tratados em relatórios da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

Para limitar a exposição humana, a União Européia (UE) estabeleceu LMRs para diferentes contaminantes alimentares em alguns alimentos crus, com base em dados toxicológicos, valores aceitáveis de ingestão diária e do desempenho de tecnologias analíticas atuais. Dentro da UE, um dos principais documentos é o Regulamento 2377/90/EC, revogado pelo Regulamento nº 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2009). As substâncias farmacologicamente ativas permitidas, que possuem um valor de LMR, estão contidas no Regulamento 37/2010 do Conselho, que prevê um LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para SAs em alimentos de origem animal quando utilizadas de forma isolada, todavia, o total de resíduos de todas as substâncias do grupo das SAs não deve exceder o valor máximo de resíduos igual a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ se em associações (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2009a).

No Brasil, a ANVISA, órgão do Ministério da Saúde (MS), coordena, supervisiona e controla as atividades de registro, informações, inspeção e controle de riscos, estabelecimento de normas e padrões relativos à segurança alimentar. O objetivo é garantir ações de vigilância sanitária de alimentos, limites de contaminantes e resíduos de medicamentos veterinários, entre outros (BRASIL, 2003). Essa atuação é compartilhada com outros ministérios, como o da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e com os estados e municípios, que integram o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.

As atividades de Vigilância Sanitária (VS) de alimentos no Brasil datam do século XVI, mas somente em 1950, através da Lei nº 1.283, estabeleceu-se atribuições e competências relacionadas a produtos de origem animal. Em 2000, a ANVISA instituiu um grupo de trabalho sobre medicamentos veterinários em alimentos, sendo que nessa época foi desenvolvido o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), com o objetivo de operacionalizar sua competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, conforme a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999 (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009;

BRASIL, 1999). Apesar de ter sido delineado em 2000 e iniciado suas atividades em 2002, o PAMVet só foi oficialmente instituído em setembro de 2003, pela RDC nº 253 (BRASIL, 2003).

O PAMVet contempla ações de colheita de amostras no comércio e análise de resíduos com o objetivo de avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários por meio do consumo de alimentos de origem animal. Embora esse programa preveja a análise de diferentes tipos de alimentos de origem animal, somente análises de leite estão sendo realizadas até o momento, como pode-se verificar em relatórios disponibilizados pela ANVISA (ANVISA, 2003).

O MAPA, que divide a responsabilidade referente aos riscos de agravo à saúde decorrente da exposição humana a resíduos de medicamentos veterinários com a ANVISA, publicou a Instrução Normativa nº 14, de 25 de maio de 2009 (BRASIL, 2009a), que aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado, que traz, em seus anexos, os limites de referência para resíduos de antimicrobianos e outros fármacos utilizados em animais, que podem trazer riscos à saúde humana, a fim de proteger a saúde dos consumidores. Entretanto, o gerenciamento e a comunicação de riscos no país têm se baseado muito mais nas consequências advindas da não adequação às exigências internacionais do que propriamente na proteção à saúde da população brasileira (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

2.3 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE SAs E TMP EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

Uma vez que na área de Toxicologia de Alimentos, as matrizes são complexas e a análise é de traços, torna-se fundamental considerar o desenvolvimento de métodos seletivos, robustos, reprodutíveis e viáveis para a aplicação na rotina analítica e com detectabilidade adequada (BEDOR et al., 2008).

Segundo Siqueira (2008), o procedimento analítico para amostras complexas consiste em diversas etapas, consideradas críticas para a obtenção de resultados confiáveis e informativos, que tipicamente incluem:

- amostragem – inclui decisões de onde e como coletar amostras que melhor atendam ao objeto ou problema a ser caracterizado, que sejam representativas do material a ser analisado;
- preparo de amostras – envolve procedimentos de extração, além de, em muitos casos, incluir etapa de purificação (*clean up*) para amostras muito complexas. Essa etapa também objetiva trazer os analitos num nível de concentração adequado para a detecção, e, assim, técnicas de preparo de amostras tipicamente incluem o enriquecimento;
- separação – onde a mistura complexa isolada que contém os analitos é subdividida em seus constituintes, geralmente por meio de técnicas cromatográficas e eletroforéticas;
- quantificação – determinação da quantidade dos compostos identificados, com a ajuda de detectores espectrofotométricos, por fluorescência e eletroquímicos. Frequentemente instrumentos mais específicos (por exemplo, espectrômetro de massa) são usados para eliminar possíveis erros na quantificação devido aos interferentes, após confirmada a identidade dos analitos;
- avaliação estatística e tomada de decisão – permite fazer uma estimativa da concentração do analito na amostra analisada e estimar incertezas. Esses dados fundamentam a tomada de decisões sobre as ações a serem implementadas diante dos resultados.

Uma das etapas mais críticas do processo é o preparo de amostras, que pode ser obtido pelo emprego de uma variedade ampla de técnicas, porém todos os métodos devem atender ao mesmo objetivo (PAVLOVIC et al., 2007):

- eliminar interferentes potenciais;
- aumentar a concentração do analito;
- se necessário, converter o analito em uma forma mais adequada para análise;
- utilizar pouca quantidade de amostra e usar menor volume de solventes orgânicos;
- obter seletividade na extração;
- definir um método robusto, reprodutível e independente da variação na amostra matriz.

O conceito básico para as técnicas de preparo de amostras é transformar

a matriz em uma amostra adequada para a análise. Este processo altera inevitavelmente as interações dos compostos com seu meio químico específico. Essas alterações são determinadas pelas propriedades físicas e químicas, tanto do analito quanto da matriz, que determinam a aplicação de diferentes técnicas de preparo de amostra e métodos analíticos, influenciando sua eficiência e reprodutibilidade (PAVLOVIC et al., 2007).

Tecidos animais são conhecidos por serem ricos em proteínas, que podem se ligar com antimicrobianos, especialmente aqueles que possuem caráter polar. Solventes orgânicos (como a acetonitrila, metanol e etanol) são comumente empregados na precipitação de proteínas em matrizes biológicas. A acetonitrila providencia alta eficiência de extração, além de minimizar a co-extração de lipídios de tecidos animais (CHIAOCHAN et al., 2010).

As SAs, como resultado das propriedades indutivas do grupamento SO_2 , são compostos que exibem comportamento anfotérico, por possuírem grupamentos químicos com caráter ácido e básico, o que permite que em determinadas faixas de pH estas moléculas se comportem como zwitterions (FIGURA 3), ou seja, capazes de manter carga positiva e negativa (HOFF, 2008). Várias influências da matriz durante a quantificação dessa classe de compostos têm sido descritas (PECORELLI et al., 2004). As propriedades físico-químicas das SAs e da TMP estão descritas na Tabela 2.

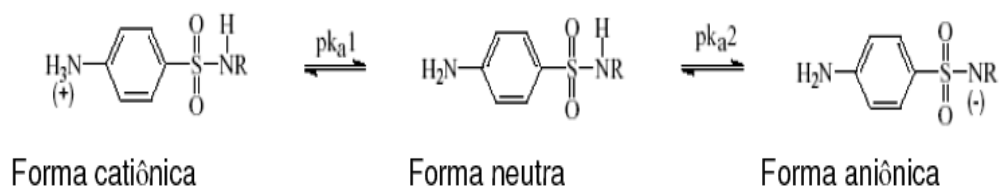


Figura 3 – Comportamento anfotérico das sulfonamidas

Fonte: HOFF (2008, p. 20).

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de sulfonamidas e da trimetoprima

Antimicrobiano	Log K_{ow}*	pKa₁**	pKa₂**
Sulfadiazina	-0,09	1,64	6,5
Sulfametoxipiridazina	0,32	2,18	7,19
Sulfametoxazol	0,89	1,39	5,81
Trimetoprima	0,91	7,12	-

Fonte: COSTI; SICILIA; RUBIO, 2010

* Log K_{ow}= logaritmo do coeficiente de partição octanol/ água.

**pka= valor de pH do meio em que 50% das moléculas de uma substância química estão na forma ionizada e 50% estão na forma não-ionizada.

Vários métodos de extração são utilizados para análise de resíduos de SAs e TMP em alimentos de origem animal, como por exemplo a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), porém, em sua grande maioria, são longos e tediosos (KOESUKWIWAT; JAYANTA; LEEPIPATPIBOON, 2007). Estes métodos podem incluir uma etapa anterior para precipitar as proteínas e, em muitos casos, LLE e SPE foram usadas em conjunto: após a extração do analito/desproteíntização por meio de extração com solvente orgânico apropriado, os extratos foram posteriormente purificados utilizando um procedimento de SPE adequado (BISWAS et al., 2007). Procedimentos baseados em dispersão da matriz em fase sólida têm sido propostos a fim de simplificar a etapa de extração (KISHIDA; FURUSAWA, 2001). Microextração em fase sólida (SPME) também tem sido utilizada para a determinação de SAs em carne, onde a extração e a concentração dos analitos são realizadas em uma única etapa (LU; CHEN; LEE, 2007).

Um passo significativo na redução do tempo para processar uma amostra foi descrito por Anastassiades et al. (2003), para análise de praguicidas, o chamado QuEChERS (Quick – rápido, Easy - fácil, Cheap – barato, Effective – eficaz, Rugged – robusto e Safe – seguro). A grande diversidade nas propriedades físico-químicas de medicamentos veterinários dificulta a combinação de várias classes em uma única análise, no entanto, este método tem sido utilizado com sucesso por alguns pesquisadores, sempre acompanhado de detecção baseada em espectrometria de massas (STUBBINGS; BIGWOOD, 2009; FRENICH, et al., 2010). Não há, até o momento, nenhum relato na literatura para determinação de SAs usando o método QuEChERS e cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos, devido ao fato da relação extrato/ amostra final, de 1 g por 1 mL, não contribuir para a utilização de detectores menos sensíveis, em relação à espectrometria de massas.

O método QuEChERS é baseado em uma extração utilizando acetonitrila, adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, os quais promovem uma partição líquido-líquido, facilitando a remoção de componentes polares da matriz. Após a centrifugação, que fornece uma separação física das fases, o *clean up* e a remoção de água residual são executados simultaneamente utilizando a extração em fase sólida dispersiva, onde um adsorvente de amina primária secundária (PSA) e sulfato de magnésio são misturados com o extrato da amostra, que depois de agitado e centrifugado, está em condições de ser analisado por um equipamento acoplado a um espectrômetro de massas (ANASTASSIADES et al., 2003).

Porém, devido a necessidade de minimizar problemas de degradação de analitos menos estáveis, desenvolveu-se uma modificação no método QuEChERS original, uma etapa de tamponamento do extrato utilizando acetonitrila contendo 1 % de ácido acético ($pK_a = 4,75$) (v/v) e simultaneamente partição líquido-líquido promovida pela adição de acetato de sódio e sulfato de magnésio (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005). O controle do pH do meio é importante para evitar a degradação de compostos sensíveis em meios ácidos e básicos. Sendo assim, é necessário que se tenha uma faixa de pH entre 4 e 5, uma vez que a mesma proporciona boas recuperações (70 a 120 %) para analitos sensíveis em meio ácido, além de garantir a estabilidade de analitos sensíveis em meio alcalino (MASTOVKA; LEHOTAY, 2004).

Ensaio de proficiência empregando QuEChERS mostraram que esta técnica apresenta robustez, sendo o reprodutível, em ensaios inter-laboratoriais. Nos Estados Unidos, este método foi adotado em 2007, como sendo o método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para determinação de resíduos de praguicidas em alimentos (LEHOTAY, 2007).

Prestes et al. (2009) citam vantagens e desvantagens do método QuEChERS sobre os métodos tradicionais, relacionado à determinação de resíduos de praguicidas em alimentos, já que este método foi desenvolvido inicialmente para esta finalidade. Dentre as vantagens, estão os altos percentuais de recuperação (> 85%) obtidos para um grande número de compostos de diferentes polaridade e volatilidade; boa exatidão e precisão; o preparo de 10 a 20 amostras entre 30 e 40 minutos; a utilização de um pequeno volume de solventes não clorados; a adição de acetonitrila, quando realizada com dispensadores, faz com que o analista tenha uma exposição mínima a este solvente; um único analista pode realizar o preparo da

amostra; não requer a utilização de muitos equipamentos, bem como utiliza um pequeno espaço físico durante a execução do método.

A principal desvantagem deste método, ainda de acordo com Prestes et al. (2009), está relacionada com a relação amostra/ extrato final, que é de 1 g por 1 mL. Este valor é menor quando comparado com aqueles obtidos por outros métodos, os quais utilizam uma etapa de concentração, apresentando relação amostra/ extrato final de 2 a 5 g por mL. Portanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos nas análises isto pode conduzir, no método QuEChERS, a valores de limites de quantificação (LQ) mais elevados para o mesmo volume de injeção.

Para análise de resíduos de SAs em alimentos, o método QuEChERS tem sido usado com sucesso por alguns pesquisadores. Aguilera – Luiz et al. (2008) utilizaram este método para determinar 18 fármacos veterinários de diferentes classes, dentre eles duas SAs, em leite. Stubbins e Bigwood (2009) determinaram 35 antimicrobianos (16 SAs) em músculo de frango, utilizando esta técnica, com detecção por LC – MS/MS.

Frenich et al. (2010) comparou quatro métodos de extração (extração com solventes, QuEChERS, MSPD e SPE) para a análise de várias classes de fármacos veterinários em ovos. A conclusão deste trabalho mostrou que o método QuEChERS extraiu poucos dos compostos estudados, porém, para as quatro SAs estudadas (sulfadimidina, sulfaclopiridazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina), foram observadas recuperações semelhantes às alcançadas com o método de SPE utilizado.

Técnicas de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (TSAI et al., 2010) e eletroforese capilar (KOWALSKI et al., 2011; CHU et al., 2009), têm sido muito utilizadas para análise de SAs em amostras de alimentos. A extensão do preparo da amostra depende do sistema de detecção utilizado, que pode ser mais ou menos seletivo e sensível. Os detectores mais usados tem sido o ultra-violeta e o arranjo de diodos (CHRISTODOULOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2007; GARCÍA-MAYOR et al., 2006), o fluorimétrico (COSTI; SICILIA; RUBIO, 2010), bem como o espectrômetro de massas (SHERIDAN et al., 2008), apresentando resultados satisfatórios em análises de alimentos (TABELA 3).

Tabela 3 - Técnicas de preparo de amostras e de detecção de sulfonamidas e trimetoprima em diferentes matrizes

Referência	Tipo de Amostra	Tipo de Extração	Equipamento de detecção	Analitos
Aguilera-Luiz et al., 2008	Leite	QuEChERS ⁽¹⁾	UPLC ⁽⁶⁾ - MS/MS ⁽⁷⁾	2 sulfonamidas mais 16 antimicrobianos
Bedor et al., 2008	Plasma humano	SPE ⁽²⁾ (Oasis HLB 30 mg, solvente de eluição – acetonitrila)	HPLC ⁽⁸⁾ – DAD ⁽⁹⁾ , HPLC – MS/MS	Sulfametoxazol e Trimetoprima
Biswas et al., 2007	Carne de Búfalo	SPE (cartucho C18, solvente utilizado – acetonitrila)	HPLC – DAD	3 sulfonamidas e trimetoprima
Bogialli et al., 2003	Leite e ovos	MSPD ⁽³⁾ (Crystobalite, usando água para eluição)	HPLC – MS ⁽¹⁰⁾	12 sulfonamidas
Cavazos-Rocha et al., 2007	Plasma e tecidos infectados de actinomicetoma	Precipitação de proteínas (acetonitrila)	HPLC – DAD e Fluorescência	Sulfametoxazol mais 4 antimicrobianos
Chico et al., 2008	Carne de frango	LLE ⁽⁴⁾ (mistura MeOH:H ₂ O)	UPLC - MS/MS	14 sulfonamidas mais 25 antimicrobianos
Gamba et al., 2009	Leite	LLE (clorofórmio/acetona), <i>clean-up</i> com cartucho de troca catiônica (SCX)	HPLC – DAD	7 sulfonamidas
Haller et al., 2002	Estrume animal	LLE (acetato de etila)	HPLC – MS	6 sulfonamidas e trimetoprima
Le Boulaire; Bauduret; Andre, 1997	Carne suína e de vitela	MSPD (C18)	HPLC – DAD e Fluorescência	8 sulfonamidas mais 5 antimicrobianos
Msagati; Nindi, 2004	Tecidos de rim e fígado, leite e urina	SLM ⁽⁵⁾	HPLC – MS	16 sulfonamidas
Pecorelli et al., 2004	Músculo	SPE (cartucho de troca catiônica forte, solvente utilizado – acetato de etila)	HPLC – DAD	10 sulfonamidas
Posyniak; Zmudzki; Mitrowska, 2005	Carne de frango	MSPD (Octadecyl – C18, solvente utilizado – acetonitrila)	HPLC – Fluorescência	6 sulfonamidas
Soto-Chinchilla; Garcia-Campaña; Gamiz-Gracia, 2007	Carne bovina e amostras de águas subterrâneas	1º extração com acetonitrila e pré-concentração com SPE (Oasis HLB)	CE ⁽¹¹⁾ – ESI ⁽¹²⁾ – MS	10 sulfonamidas e trimetoprima
Stubbings; Bigwood, 2009	Carne de frango	QuEChERS	HPLC - MS/MS	16 sulfonamidas mais 35 antimicrobianos

⁽¹⁾Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; ⁽²⁾Solid phase extraction; ⁽³⁾Matrix solid-phase dispersion; ⁽⁴⁾Liquid-liquid extraction; ⁽⁵⁾Supported liquid membrane; ⁽⁶⁾Ultra performance liquid chromatography; ⁽⁷⁾Tandem mass spectrometry; ⁽⁸⁾High-performance liquid chromatography; ⁽⁹⁾Diode-array detector; ⁽¹⁰⁾Mass spectrometry; ⁽¹¹⁾Capillary electrophoresis; ⁽¹²⁾Electrospray ionization.

2.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos de origem animal como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas normas legais. Para que estes métodos garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que sejam normalizados e cumpram requisitos que garantam resultados confiáveis. Com esse objetivo, são delineados procedimentos de validação do processo analítico empregado, como garantia de qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (PASCHOAL et al., 2008).

O desenvolvimento do método analítico envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (ICH, 1996; COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002; BRASIL, 2003a; INMETRO, 2010).

No Brasil, a validação de métodos para a análise de fármacos é regulamentada pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003a). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados parâmetros como: especificidade (seletividade), faixa linear, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio) e exatidão.

Métodos analíticos para resíduos de contaminantes tóxicos em alimentos requerem considerações técnicas especiais quando comparados a métodos delineados para outros fins, como em análises de medicamentos, por exemplo. LMRs específicos para cada analito alvo são estabelecidos, os quais devem ser levados em consideração no estabelecimento de um protocolo para validação do método analítico a ser empregado na determinação desses resíduos nos alimentos (PASCHOAL et al., 2008).

Na literatura internacional são descritos parâmetros usados para a análise

de resíduos em produtos de origem animal. Em 2002, a União Européia (UE) emitiu uma regulamentação específica (2002/657/EC) referente ao desempenho dos métodos oficiais e interpretação dos resultados em produtos de origem animal. Além dos parâmetros tradicionais, tais como a linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez entre outros, novos testes foram introduzidos, tais como o limite de Decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), para indicar a aplicabilidade do método desenvolvido (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002). No Brasil esses parâmetros estão descritos na Instrução Normativa nº 24, de 14 de julho de 2009 (BRASIL, 2009b).

O estabelecimento do $CC\alpha$ e da $CC\beta$ depende de se a substância (fármaco veterinário) a ser analisada na matriz (alimento) possui um LMR ou apenas um limite mínimo de performance requerido (LMPR) definido (PASCHOAL et al., 2008). O LMPR é o teor mínimo de uma substância quantificável em uma amostra. Tem o objetivo de padronizar o desempenho analítico mínimo requerido do método, cuja substância sob análise não possui limite permitido definido. Nestes casos, $CC\alpha$ e $CC\beta$ devem ser menores que o LMPR, que são estabelecidos pela Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (BRASIL, 2009b).

O $CC\alpha$ é o limite a partir do qual uma amostra pode ser declarada não conforme (amostra que contém o analito no caso de se tratar de uma substância não permitida ou que o contém em concentrações superiores ao LMR estabelecido) com uma probabilidade de erro igual a α (erro de 1% para substâncias não permitidas e de 5% para substâncias com LMR) (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002; BRASIL, 2009b). Já, o $CC\beta$ é o limite a partir do qual o analito pode ser detectado, identificado e/ou quantificado com uma probabilidade de erro β (erro de 5% para todas as substâncias permitidas ou não). No caso das substâncias com LMR, é a concentração que o método é capaz de detectar no limite permitido com certeza estatística de $1-\beta$ (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2002; BRASIL, 2009b).

Para compostos com LMR, o $CC\alpha$ pode ser determinado de duas formas: analisar pelo menos 20 amostras branco por matriz, fortificadas com o analito no nível do LMR. A concentração no LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente equivale ao $CC\alpha$ ($\alpha= 5\%$); outra forma é fortificar amostras branco em níveis de concentração equidistantes ao redor do LMR, analisar as mesmas e plotar uma curva analítica. O valor de $CC\alpha$ será igual ao LMR (concentração) mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial ($\alpha= 5\%$)

(PASCHOAL et al., 2008).

A transformação do resultado obtido em concentração é alcançada utilizando uma curva analítica, construída em amostras branco fortificadas. A curva deverá ter seis níveis de fortificação, incluindo o ponto zero; entre esses níveis deverão constar: $\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR (FREITAS, 2008).

Para substâncias que possuem um LMPR, o $CC\alpha$ pode ser estabelecido por dois procedimentos distintos: analisar pelo menos 20 amostras branco por matriz e calcular a razão sinal-ruído na faixa do tempo de retenção do analito. O $CC\alpha$ é três vezes a razão sinal ruído; outra forma é fortificar amostras branco ao nível do LMPR e acima deste valor em concentrações equidistantes. Analisar as amostras e plotar um gráfico do sinal em função da concentração adicionada. A concentração correspondente ao intercepto e mais 2,33 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial do intercepto equivale ao $CC\alpha$ ($\alpha = 1\%$) (PASCHOAL et al., 2008).

O valor de $CC\beta$, para compostos que possuem LMR, de maneira semelhante ao $CC\alpha$, pode ser determinado de duas formas: analisar pelo menos 20 amostras branco por matriz, fortificadas com o analito no limite de decisão ($CC\alpha$). O valor de $CC\alpha$ mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente equivale ao $CC\beta$ ($\beta = 5\%$); ou fortificar amostras branco em níveis de concentração equidistantes ao redor do LMR, analisar a mesma e plotar uma curva analítica. Calcular o desvio padrão na concentração correspondente ao $CC\alpha$. O valor de $CC\beta$ será igual ao valor de $CC\alpha$ (concentração) mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial ($\beta = 5\%$) (PASCHOAL et al., 2008).

Mais uma vez, com base na curva analítica é feita a correspondência do valor encontrado à concentração $CC\beta$. A Figura 4 é uma representação estatística da dispersão dos sinais para analitos com LMR. A área do sinal ao nível do LMR dá-nos a concentração $CC\alpha$ com um erro associado de 5 %, erro esse que representa o número de possíveis falsos positivos. A amplitude mínima do sinal de $CC\beta$ corresponde ao erro – 5 % – associado aos falsos negativos (FREITAS, 2008).

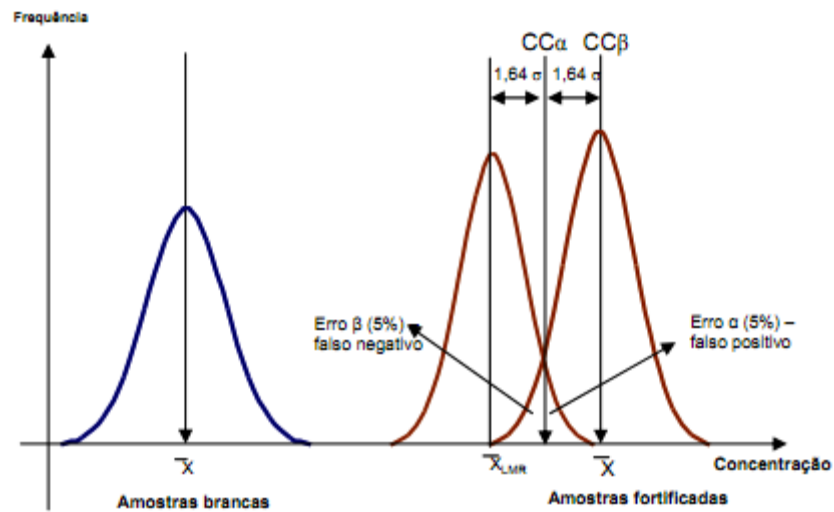


Figura 4 – Representação estatística do limite de decisão e capacidade de detecção para substâncias com LMR estabelecido

Fonte: FREITAS (2008, p. 32).

Para substâncias que possuem um LMPR definido, o CC_{β} pode ser determinado das seguintes formas: analisar pelo menos 20 amostras branco por matriz, fortificadas com o analito na concentração do CC_{α} . O CC_{β} é igual ao CC_{α} mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial ($\beta=5\%$); outra forma é fortificar amostras branco em níveis de concentração equidistantes ao redor do LMPR. Analisar as amostras e plotar um gráfico do sinal em função da concentração adicionada. A concentração correspondente ao CC_{α} mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial da média mensurada contendo CC_{α} equivale ao CC_{β} ($\beta=5\%$) (PASCHOAL et al., 2008).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A importância da utilização de medicamentos de uso veterinário na cadeia de produção animal está intimamente relacionada aos progressos experimentados por esse segmento da agricultura nas duas últimas décadas. Os benefícios aparentes desses produtos veterinários e a vinculação da utilização dos mesmos às expectativas de desempenho dos animais vêm sistematicamente massificando sua recomendação e utilização no Brasil. Entretanto, existem questionamentos permanentes a respeito da eficácia desses produtos uma vez que o desempenho predito dos animais manejados sob condições ideais raramente é alcançado em condições de campo. Diante dessas constatações, surgem algumas indagações relacionadas aos processos envolvidos com a administração dos medicamentos veterinários.

A hipótese desse projeto considera que o uso inadequado pode contribuir por perdas significativas na produção animal, inclusive com o comprometimento da comercialização internacional do produto alimentar como consequência da presença de resíduos.

Considerando que a classe de antimicrobianos usados em animais é muito diversa, decidiu-se por priorizar a triagem dos fármacos segundo o maior número de medicamentos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e que representam porção significativa do mercado de carne (bovinos, aves e suínos) e cujos protocolos de determinação poderiam ser validados, garantindo competência e soberania nacional nesse monitoramento.

Nesse contexto, foram escolhidos para esse estudo os princípios ativos SMX e TMP, nos medicamentos em que estão presentes como associações. Além disso, decidiu-se avaliar a presença das SAs SDZ, SPZ e SMX em carne de frango, por esse ser um alimento de alto consumo e, esses fármacos serem amplamente utilizados, tanto para o tratamento de patologias quanto para contribuir com o aumento da produção, quando adicionados na alimentação das aves, em doses subterapêuticas (PECORELLI et al., 2004).

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver método cromatográfico para a determinação de SMX e TMP em medicamentos de uso

veterinário, para ser empregado no controle de qualidade e na fiscalização de insumos agropecuários. Ainda, constituiu escopo do trabalho, desenvolver método para a determinação de SAs em carne de frango.

Para alcançar esses objetivos, as etapas desenvolvidas do trabalho foram:

a) para a determinação dos analitos em medicamentos veterinários:

- otimizar o método: cromatografia líquida, com detector por arranjo de diodos, para a detecção de SMX e TMP, em preparações farmacêuticas de uso veterinário;

- validar o método otimizado, através dos parâmetros: especificidade, linearidade, faixa linear, precisão intra- e inter-ensaio, limite de quantificação, exatidão e robustez;

- avaliar a seletividade cromatográfica, por meio de estudos de degradação, sob condições de estresse, dos medicamentos contendo os analitos em questão;

- analisar medicamentos veterinários adquiridos no comércio utilizando o método desenvolvido, para a demonstração da aplicabilidade do mesmo.

b) para a determinação dos analitos em carne de frango:

- otimizar o método constituído por cromatografia líquida com detector por arranjo de diodos, utilizando a técnica QuEChERS, para o preparo de amostra, para a determinação de SAs em carne de frango;

- validar o método desenvolvido, através dos parâmetros: especificidade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão e robustez, recuperação, limite de decisão e capacidade de detecção em amostras de carne de frango;

- avaliar a aplicabilidade do método em amostras de peito de frango, comercializadas em Alfenas- Minas Gerais e região.

4 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão de literatura, 1 artigo científico (número mínimo), tendo o mestrando como primeiro autor, representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no programa.

No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, na forma de artigos submetidos para publicação em periódicos da área de Farmácia.

4.1 ARTIGO I

O artigo I consiste no desenvolvimento e validação de método para o controle de qualidade dos medicamentos veterinários que contenham a associação sulfametoxazol e trimetoprima. O artigo foi submetido à Revista Chromatographia e encontra-se em fase de análise pelos revisores.

**VETERINARY MEDICINES: A SIMULTANEOUS METHOD FOR
SULPHAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM**

TAHAN¹, Gabriela Padovani; MACHADO^{1*}, Simone Caetani; MALAGUTI¹, Evandro Conti; RATH, Susanne²; MARTINS¹ Isarita

¹Laboratory of Analysis of Toxicants and Drugs, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro 700, Alfenas, MG, Brazil, 37130-000

²Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, University of Campinas, P.O. Box 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 35 3299 1342; fax: +55 35 3299 1067;
E-mail address: simonecaetani@uolcom.br

VETERINARY MEDICINES: A SIMULTANEOUS METHOD FOR SULPHAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM

Abstract

This study describes the development of a method for simultaneous analysis of sulphamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) through the use of high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector, with the application to veterinary medicine. Satisfactory chromatographic separation of SMX and TMP was isocratically with a C18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m). A mobile phase consisting of water, pH 3.5, and methanol (60:40, v/v) was delivered at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ for 5 minutes, after which the flow was increased to 1.8 mL min⁻¹. These conditions enabled detection of the analytes in a run time of 12 minutes. Detection of the drugs was performed at 213 nm. Linearity was demonstrated in the range of 5 to 70 μ g mL⁻¹ for SMX and 1 to 30 μ g mL⁻¹ for TMP ($r^2 \geq 0.99$ for both compounds). The relative standard deviation was $\leq 5\%$, and test of standard addition indicated that the method was accurate. The resultant stressed samples were analysed by the method. The proposed method shows great potential for simultaneous analysis of the drugs evaluated and represents a new alternative approach to quality control of veterinary medicines.

Key-words: sulphamethoxazole, trimethoprim, HPLC, veterinary medicines.

1. Introduction

Veterinary drugs are used worldwide to improve animal health, provide economic gains and increase food industry productivity of food of animal origin [1]. The broad goals of the use of drugs on animals are to preserve the health of the animals, improve animal production and protect public health. However, veterinary drug control is only one aspect of these broad subjects of public policy and legislation, and the specific goals of veterinary drug administration are much narrower [1,2].

According to the Brazilian National Association of Industrial Products for Animal Health, the largest drug expenditure in 2007, with a value of approximately 6.5 million dollars, was in the class of antimicrobials. The importance of this class of drugs ensures interest in screening and developing new drug evaluation systems based on assessment of appropriate laboratory protocols and routines for this purpose [3].

Intentional or unintentional alterations in the concentrations initially reported for a particular drug can account for significant losses in the animal industry. Errors in administration of these drugs can often cause more harm than good and can, in turn, affect international trading opportunities [2].

Sulphonamides are a class of antimicrobial agents that are of considerable use in human and veterinary medicine. Sulphonamides, were the first agents used to treat bacterial infections. Sulphonamides are widely used in veterinary medicine. However, incorrect administration of these drugs can lead to the accumulation of drug residues in products intended for human consumption. These residues are considered to have toxicological potential and can cause significant adverse reactions, including allergic reactions [4].

Sulphamethoxazole (SMX), or 5-methyl-3-sulphanilamidoisoxazol, is a sulphonamide-class drug that is widely used in veterinary practice, as it presents a wide spectrum of action and a relatively low cost. It is a structural analogue of amino benzoic acid (PABA) and competitively inhibits a bacterial enzyme, dihydropteroatesynthetase, which is responsible for incorporation of PABA dihydrofolic acid (folic acid). Thus, SMX blocks dihydrofolic acid synthesis and decreases the amount of metabolically active tetrahydrofolic acid (a cofactor in the

synthesis of purines, thymidine and DNA). Unlike eukaryotic cells, bacteria do not utilise folic acid or its preforms, and thus they must synthesise it from PABA. The action of sulphonamides is antagonised by PABA and its derivatives (procaine and tetracaine) and by pus and cellular debris [5-8].

Typically, drugs containing sulphonamides consist of multiple compounds. One of the most common combinations is a 5:1 ratio of trimethoprim and sulphamethoxazole, two compounds with synergistic effects [6,7] and a low probability of bacterial resistance [9]. Trimethoprim (TMP), or 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-pyrimidine, is a lipophilic weak base with bacteriostatic properties and is structurally related to pyrimethamine. TMP binds reversibly to the bacterial enzyme dihydrofolate reductase, inhibiting its activity. The affinity of TMP to this bacterial enzyme is up to 100,000 times greater than its affinity to the equivalent human enzyme. TMP exerts its effects on a stage of folate biosynthesis immediately subsequent to the stage upon which sulphamethoxazole acts, thus prompting a synergistic action between the two drugs [5-8].

Previous studies have discussed various analytical methods for the estimation of SMX concentration, either individually or in combination with TMP in human pharmaceutical products. Analytical methodologies with high throughput should be considered in the analysis of drugs. [10] The simultaneous determination of the concentrations of both of these compounds generally utilises spectrophotometric methods with multicomponent analysis using a diode- array detector [11,12] and liquid chromatography-HPLC [13-19]. Kulikov et al. (2005) [20] compared micellar liquid chromatography and reverse-phase liquid chromatography and concluded that the techniques present similar efficiency, sensitivity and selectivity for determination of SMX and TMP concentrations. Normal-phase high performance thin layer chromatographic methods have also been reported for analysis of these drugs [21].

British pharmacopoeial methods for veterinary medicine recommend analysis of TMP through spectrophotometric methods, while United States pharmacopoeial methods for SMX and TMP analysis in human medicines is time consuming and requires expensive reagents, making this type of analysis tedious for routine analysis [22,23]. Thus, it is desirable to develop methods that serve as alternatives to the current official methods of SMX and TMP analysis.

The aim of this work was to develop a simple and fast HPLC assay for

measuring SMX and TMP in veterinary medicinal products. This assay would be applied to simultaneous analysis for quality control and monitoring of agricultural inputs containing the active ingredients. Figure 1 shows the chemical structures of these two drugs. The development of the analytical method involves evaluation processes that estimate the efficiency of the laboratory routines. A given method is considered valid if its characteristics agree with pre-established requirements. The purpose of this form of validation is to demonstrate that the analytical method is suitable for the given application [24-28].

2. Experimental Procedures

2.1 Chemicals and solutions

Analytical grade phosphoric acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and methanol (HPLC-grade) was purchased from Tedia (Fairfield, USA). Sulphamethoxazole (SMX), purity > 98%, was obtained from Sigma- Aldrich® (St. Louis, USA) and trimethoprim (TMP), purity > 99%, was obtained from Fluka (Steinheim, Germany).

Standard stock solutions of the drugs were prepared by dissolving 100 mg (± 0.1 mg) of each compound in 100 mL of methanol. The solutions were stored at -18°C between experiments. Standard working solutions were prepared daily by diluting the standard stock solutions with water to within the range of $5\text{-}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for SMX and $1\text{-}10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for TMP.

Throughout the study, water was obtained from a Milli-Q system from Millipore (Bedford, USA). Prior to analysis, all solutions were filtered through $0.22\text{-}\mu\text{m}$ membrane filters from Millipore (São Paulo, Brazil).

2.2 Instrument and chromatography conditions

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ATvp (Kyoto, Japan) gradient system equipped with a Shimadzu SIL-10AF (Kyoto, Japan) auto-injector with a 50- μ L loop. The column oven was a Shimadzu CTO-10ASvp (Kyoto, Japan) operated at ambient temperature (25°C). Detection was performed with a Shimadzu SPD-10Avp (Kyoto, Japan) detector. Detection of the drugs was performed at 213 nm. Chromatographic separation was achieved using a C18 THERMO BDS HYPERSIL (150 x 4.6 mm; 5 μ m) column protected by a similar guard-column (40 x 4.6 mm). The mobile phase consisted of a mixture of water (adjusted with phosphoric acid to pH 3.5) and methanol (60:40, v/v) and was delivered at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ for the initial 5 minutes, after which the flow was increased to 1.8 mL min⁻¹. Data acquisition and analysis were performed with the Class-VP software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.3 Sample preparation

Veterinary medicines (injection, n=2) were purchased from a local veterinary store. The labels on the commercially available samples indicated that the medicines contained 20 g of SMX and 4 g of TMP per 100 mL of solution. An accurate quantity of the sample was transferred to a 100 mL volumetric flask and dissolved with mobile phase to obtain 30 μ g mL⁻¹ SMX and 6 μ g mL⁻¹ TMP. The mixture was sonicated for approximately 15 minutes until the samples were fully dissolved, and the volume was brought up with mobile phase. The solutions were filtered through a 0.22- μ m membrane filter prior to HPLC analysis.

2.4 Method validation

The method was *internally* validated using the following performance criteria: linearity and linear range, sensitivity, intra-assay and inter-assay precision, accuracy and ruggedness, according to RE n° 899 of the National Agency of Sanitary Surveillance [27]. We also conducted a forced degradation study on the samples.

Linearity, linear range and sensitivity were established through the analytical curve obtained at six concentration levels ($n=6$ for each concentration) in the range of 5 to 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of SMX and 1 to 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TMP. The sensitivity was determined as the slope of the analytical curve.

Ruggedness tests were conducted using the Youden approach. Eight determinations were made, using a combination of the factors with variations (Table 1, 2). The influence of the variation was evaluated by comparing the values obtained from the formulas with those obtained from the proposed method (Table 3).

A forced degradation study was also conducted on samples containing the drugs (in three replicates, containing 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of SMX and 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TMP) that were exposed to extreme conditions. Intentional degradation was initiated by exposing 10 mL of the reference or test stock solutions to 20 mL of 1 mol L^{-1} hydrochloric acid/sodium hydroxide for 1 and 24 h at 60 °C (in a water bath). The solutions were withdrawn to a 10 mL volumetric flask, allowed to equilibrate to room temperature and neutralised with acid or base (when necessary). Oxidative degradation of the sample solution was conducted in a water bath maintained at 60 °C for 1 and 24 h by exposing equal volumes of the solution and a 1 mol L^{-1} hydrogen peroxide solution. The solution was allowed to attain ambient temperature and diluted to the proper volume with water.

Blank solutions were prepared by the aforementioned procedure wherein stock solutions were replaced with the diluent. The method's analytical data were collected at 213 nm. Additional diode array detector (DAD) data were collected for the peak purity evaluation.

The intra-assay precision (repeatability) of the method, expressed as the relative standard deviation of the peak area measurements ($n=5$), was evaluated by analysing the results obtained with the method operating over the course of one day under the same conditions using solutions of each analyte at three concentrations: 5, 30 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for SMX and 1, 6 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for TMP. The inter-assay precision was determined for the same three concentrations and the analyses were performed on three separate days.

Accuracy was evaluated through analyses of veterinary formulations, performing three replicates for each formulation, using the proposed HPLC-UV. Also, the accuracy was tested for standard addition of the 20, 40 and 60 % levels at the

middle concentration ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$ for SMX and $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ for TMP).

3. Results and Discussion

All veterinary medicinal products that are to be commercialised should be subject to authorisation issued by proper authorities. Quality control methods are important tools for this authorisation application. Thus, we developed a method to detect the presence of two drugs extensively used in veterinary clinical practice, sulphamethoxazole and trimethoprim, in a single analysis. This method provides the capability to conduct comprehensive evaluation of quality control of formulations containing these drugs.

Figure 2 shows the UV spectra of the drugs measured by a DA detector. These data provide that at 213 nm is possible to detect and to quantify both analytes, although SMX displays a peak at 268 nm. The working conditions for the HPLC method were established by preparing various mobile phase systems to provide chromatographic separation (Figure 3). SMX and TMP were chromatographically separated by an isocratic mode using a reverse phase column and a mobile phase composed of water (adjusted to pH 3.5) and methanol (60:40, v/v), delivered at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} for 5 minutes followed by an increase to 1.8 mL min^{-1} . These conditions enabled us to detect the analytes in a run time of 12 minutes, a length of time that can be easily applied in the routine of quality control. Analysis of the analyte-free mobile phase did not show any interference in the retention time of the compounds studied.

The widespread use of HPLC in routine analysis makes it important to develop and thoroughly validate satisfactory HPLC methods [13-19]. System suitability was evaluated prior to the validation experiments. These tests are used to determine whether the resolution and repeatability of the system are adequate for the analysis. Further, they are utilised to check overall system performance.

Parameters such as plate count, tailing factors and resolution were determined and compared against the specifications, as demonstrated in Table 4. These data indicated that the system was potentially suitable since the results of the test were considered satisfactory according to Shabir, 2003 [29], who reported an

acceptable range of plate count ≥ 2000 , resolution ≥ 2.0 and tailing factor between 0.5 and 2.0. Linearity was demonstrated over the concentration points of 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for SMX and 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for TMP. These results are shown in Table 4 and were considered acceptable, as the correlation coefficients (r^2) were ≥ 0.99 for both compounds.

Ruggedness testing was conducted using the Youden approach. The influence of variation was evaluated by comparing the values obtained from the formulas (shown in Table 3) with those obtained from the proposed method (nominal parameters). No variations of greater than two standard deviations from the results obtained from proposed method (nominal parameters) were observed.

Forced degradation or stress testing is undertaken to demonstrate specificity when developing stability-indicating methods, particularly when little information is available about potential degradation products. These studies also provide information about the degradation pathways and degradation products that could form during storage. Forced degradation studies may help facilitate pharmaceutical development as well in areas such as formulation development, manufacturing, and packaging, in which knowledge of chemical behavior can be used to improve a drug product [30]. The degradation test was performed samples (in three replicates) containing 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of SMX and 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TMP that were exposed to extreme conditions (20 mL of 1 mol L^{-1} hydrochloric acid/sodium hydroxide, 60 °C for 1 and 24 h) to trigger intentional degradation. Additionally, samples were exposed to 1 mol L^{-1} hydrogen peroxide solution to trigger oxidative degradation. The results of these experiments are shown in Table 5. No interference peak was observed in the retention time of the analytes.

Intra- and inter-assay precision were assessed at three concentrations and the results are shown in Table 6. All values for the relative standard deviations were below 5% and, therefore, considered acceptable for analysis of pharmaceutical formulations. The solutions were freshly prepared to ensure stability of the analytes. However, solutions analysed 24 hours after preparation did not show any appreciable change in assay values. In order to demonstrate the validity of the proposed method, accuracy tests were carried out to analyse commercial products with standard additions (Table 6).

In order to apply the proposed method, veterinary medicines (injection, n=2) were purchased from a local veterinary store. The labels on the commercially

available samples indicated that the medicines contained 20 g of SMX and 4 g of TMP per 100 mL of solution. The results of the samples were compared with the values indicated on the product labels (Table 7). The relative errors observed were below 5%, indicated that the results were accurately obtained. No differences were observed between the label values and the measured values.

5. Conclusions

Our results indicate that the proposed method is sufficiently linear, robust, precise and accurate. It is simple, cheap and rapid and does not involve any complex analyte separation or tedious sample preparation. Together, our data indicate that the method can be used in routine quality control analysis of veterinary medicines containing sulphamethoxazole and trimethoprim.

Acknowledgement

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil (processes number CDS-APQ-4487-4.04/07 and CDS-PPM-00055-09).

References

1. Acar JF, Moulin G (2006) *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 25: 775-792.
2. Fingleton J Legislation for veterinary drugs control. *FAO Legal papers on line*, August 2004. Available: <http://www.fao.org/legal/prs-ol/lpo38.pdf>.
3. SINDAN. Brazilian National Association of Industrial Products for Animal Health. . Available in: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Accessed July 2010.
4. Lofflin J (2005) *Med Vet* 100: 12-19.
5. Tavares W (1996) *Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos*. Atheneu, São Paulo.

6. Walsh P (2000) Physicians Desk Reference (PDR) Medical Economics Company, Montvale, NJ.
7. Brunton LL, Lazo JS, Parker, KL (2006) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.. McGraw- Hill, Rio de Janeiro.
8. Giguère S, Prescott JF, Baggot JD (2006) Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Blackwell Publishing, Oxford.
9. Duijkeren EV, Vulto AG, Miert ASJPAMV (1994) J Vet Pharm Ther 17: 64-73.
10. Silva FEB, Ferrão MF, Parisotto G, Müller EI, Flores EMM (2009) J Pharm Biomed Anal 49: 800-805.
11. Berzas Nevado JJ, Lemus Gallego JM, Castaneda Penalvo G, Fresenius J (1992) Anal Chem 342: 723-728.
12. Altesor C, Corbi P, Dol I, Knochen M (1993) Analyst 118: 1549-1553.
13. Astbury C, Dixon JS (1987) J. Chromatogr. 414: 223-227.
14. Başçi NE, Bozkurt A, Kayaalp SO (1990) J. Chromatogr. 527: 174-181.
15. Hartig C, Strom T, Jekel M (1999) J. Chromatogr. A 854: 163-173.
16. Akay C, Ozkan SA (2002) J Pharm Biomed Anal 30: 1207-1213.
17. Hung CT, Perrier DG (1985) J Liq Chromatogr 8:521-526.
18. Hess S, Akermann M, Ropte D, Eger K (2001) J Pharm Biomed Anal 25:531-538.
19. Barbarin N, Henion JD, Wu Y (2002) J Chromatogr A 970:141-154.
20. Kulikov AU, Verushkin AG, Loginova LP (2005) Chromatographia 61: 455-463.
21. Shewiyo DH, Kaale E, Risha PG, Dejaegher B, Smeyers-Verbeke J, Vander Heyden Y (2009) J Chromatogr A 1216: 7102-7107.
22. British Pharmacopoeia (2009), Version 2.0 [CD-ROM] The Stationary Office Ltd.
23. United States Pharmacopoeia, 32th edn (2008) ,[CD-ROM] Easton, Rand McNally, Tounton.
24. International Conference on Harmonization (1997) Q2B: Validation of analytical procedures: methodology. US FDA Federal Register, vol 62, May 1997, p.27463.
25. Food and Drug Administration (2000) Analytical procedures and method validation. US FDA, Rockville. 33 p.
26. European Commission. Commission Decision- 2002/657/EC. Council Directive

96/23/EC. Available in: http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32002D0657&model=guichett. Accessed: October/2010.

27. National Agency of Sanitary Surveillance - Brazil. (2003) Resolution nº 899. Available in: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Accessed in July 2009.

28. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (2003). Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008.

29. Shabir GA (2003) J Chromatogr A 987: 57-66.

30. International Conference on Harmonization (1994) Q1A: Stability Testing of New Drug Substances and Products. US FDA Federal Register, vol 59, September 1997, p.48753.

Table 1. Factors evaluated for ruggedness for the proposed method.

Factor	Nominal (+)	Variation (-)
water adjusted to pH 3.5: methanol (v,v)	60:40	50:50
pH of the mobile phase	3.5	3.7
column temperature (°C)	25	35
sample diluents	mobile phase	methanol

Table 2. Experiments for evaluating the ruggedness of the proposed method.

Factor	Experiment assayed							
	1	2	3	4	5	6	7	8
water adjusted to pH 3.5: methanol (v,v)	+	+	+	+	-	-	-	-
pH of the mobile phase	+	+	-	-	+	+	-	-
column temperature (°C)	+	-	+	-	+	-	+	-
sample diluents	+	+	-	-	-	-	+	+
Results	a	b	c	d	e	f	g	h

Table 3. Variation effect evaluation for ruggedness of the proposed method.

Factor	Formula to variation effect
water adjusted to pH 3.5: methanol (v,v)	$(a+b+c+d)/4 - (e+f+g+h)/4$
pH of the mobile phase	$(a+b+e+f)/4 - (c+d+g+h)/4$
column temperature (°C)	$(a+c+e+g)/4 - (b+d+f+h)/4$
sample diluents	$(a+b+g+h)/4 - (c+d+e+f)/4$

Table 4. System suitability* and analytical curve parameters for simultaneous determination of sulphamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) by HPLC-UV proposed method.

Parameter	SMX	TMP
Retention time (min)	3.7	8.1
Plate counter (N)	10347.7	34560.5
Resolution**	-	7.7
Tailing factor (T)	1.5	1.3
Capacity factor (k)	2.4	5.1
Sensitivity	44892	47256
Intercept	22168	29566
Linearity (r^2)	0.9997	0.9940

*Reference values: $N \geq 2000$; $R_s \geq 2$; $0,5 \leq T \leq 2$; $k > 2$

** Resolution was calculated between: TMP and SMX

Table 5. Degradation test in different conditions applied on sample (three replicates containing $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ of sulphamethoxazole (SMX) and $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ of trimethoprim (TMP)).

Condition	% Mean relative error (relative standard deviation)	
	SMX	TMP
1 mol L⁻¹ NaCl		
after 1 hour	-1.7 (0.7)	+4.3 (0.8)
after 24 hours	-1.2 (0.8)	+6.1 (0.6)
1 mol L⁻¹ HCl		
after 1 hour	-0.1 (0.8)	+5.1 (0.6)
after 24 hours	+0.1 (0.5)	+7.3 (1.2)
1 mol L⁻¹ H₂O₂		
after 1 hour	-7.9 (0.8)	-27.0 (1.7)
after 24 hours	-11.0 (1.3)	-27.6 (1.9)

Table 6. Intra- and inter-assay precision (n=5) and accuracy (n=3) for the determination of sulphamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) by the proposed method.

Precision	SMX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			TMP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	10	30	70	2	6	30
intra-assay (% RSD*)	1.0	0.7	0.4	0.9	0.8	0.9
interassay (% RSD*)	0.7	2.6	0.4	0.9	3.1	0.9
Accuracy	SMX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			TMP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	36	42	48	7.2	8.4	10.8
standard addition (% relative error)	-0.6	+0.1	-0.3	-1.7	-2.2	-1.3
^a (RSD*)	1.1	0.6	0.4	1.0	1.1	0.7

^aRSD (Relative standard deviation)

Table 7. Sulphamethoxazole and trimethoprim determination, in commercial veterinary products, contained 20 g of sulphamethoxazole (SMX) and 4 g of trimethoprim (TMP) per 100 mL of solution, by the proposed method.

	SMX	TMP
	experimental	experimental
Sample 1 (n=3)	19.4	3.9
^a s (g/100 mL)	0.19	0.07
Intra-assay precision		
^b (% RSD)	0.98	1.8
Sample 2 (n=3)	20.1	4.1
^a s (g/100 mL)	0.20	0.1
Intra-assay precision		
^b (% RSD)	0.99	2.7

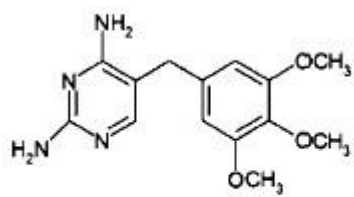
^as: estimate of standard deviation; ^bRSD: relative standard deviation

Figure captions

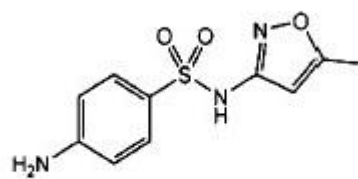
Fig.1 Chemical structure of the drugs: (a) trimethoprim and (b) sulphamethoxazole.

Fig.2 Spectra from a Shimadzu SPD-M10Avp (Kyoto, Japan) diode array detector, for standard solutions of the drugs ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Mobile phase: water (adjusted to pH 3.5, with phosphoric acid): methanol (60:40, v/v); column: C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) with a similar guard-column (4 mm x 4.6 mm).

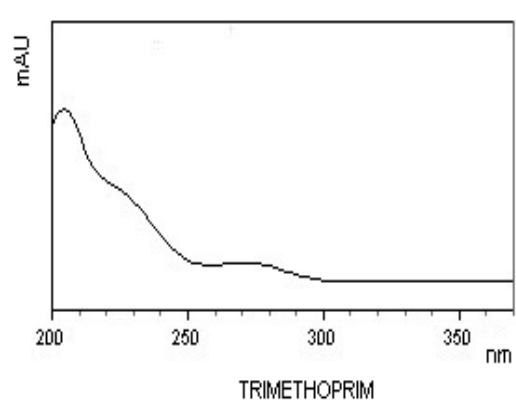
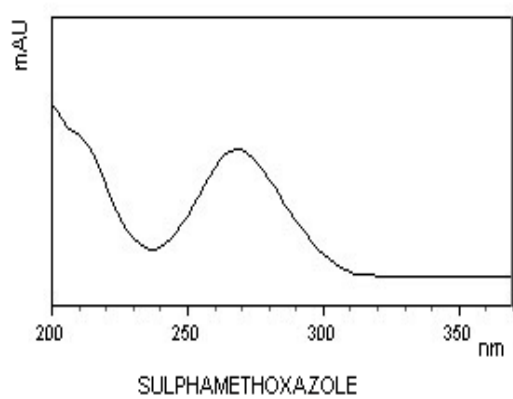
Fig.3 Typical HPLC chromatograms, in optimal conditions evaluated: (1) standard containing $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ of sulphamethoxazole and $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ of trimethoprim (B); (2) injection preparation containing 20g of sulphamethoxazole and 4 g of trimethoprim (B). Mobile phase: water pH 3.5: methanol (60:40, v/v); column: C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) protected by a similar guard-column (40 x 4.6 mm).

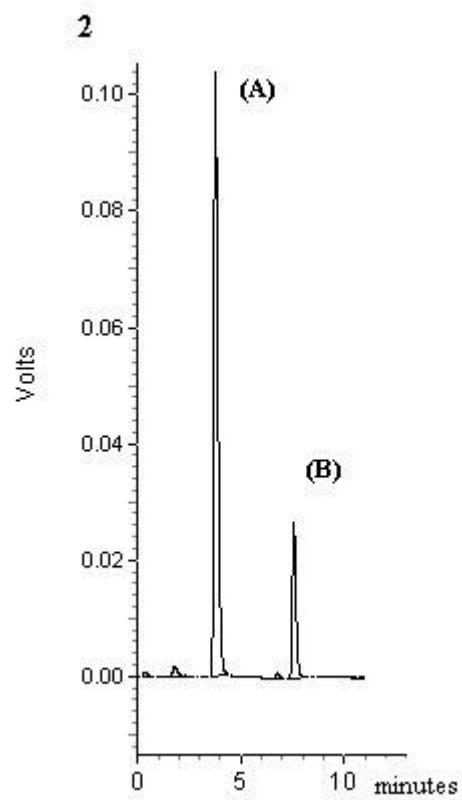
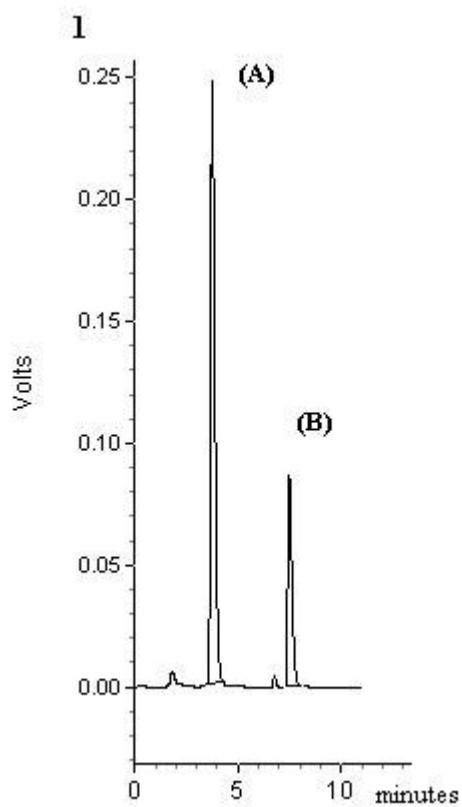


(a)



(b)





4.2 ARTIGO II

O artigo II consiste no desenvolvimento de um método QuEChERS – HPLC – DAD para análise de sulfonamidas em carne de frango. O artigo foi submetido à Revista Food Chemistry e encontra-se em fase de avaliação pelos revisores.

DEVELOPMENT OF A QUECHERS-HPLC-DAD METHOD FOR THE ANALYSIS OF SULPHONAMIDES IN CHICKEN BREAST

MACHADO¹, Simone Caetani; LANDIN-SILVA¹, Mariane; RATH, Susanne²; MARTINS^{1*}, Isarita

¹Laboratory of Analysis of Toxicants and Drugs, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro 700, Alfenas, MG, Brazil, 37130-000

²Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, University of Campinas, P.O. Box 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 35 3299 1342; fax: +55 35 3299 1067;
E-mail address: isarita@unifal-mg.edu.br

DEVELOPMENT OF A QUECHERS-HPLC-DAD METHOD FOR THE ANALYSIS OF SULPHONAMIDES IN CHICKEN BREAST

Abstract

The development and validation of a QuEChERS-HPLC-DAD method using a Lichrospher 60 RP-Select B column (25 cm x 4.6 mm x 5 μ m) at 40°C, mobile phase constituted by phosphate buffer: acetonitrile (75:25, v/v) at a initial flow rate of 0.5 mL min⁻¹, increased by 1.2 mL min⁻¹ (total run time of 20 min) and at 265 nm is presented for simultaneous determination of sulpha compounds: sulphadiazine, sulphamethoxyipyridazine and sulphamethoxazole in chicken breast samples. QuEchERS is inexpensive, fast and easy, and the extraction of the analytes of the matrix was successfully employed. In addition, the method presented linearity, in the range of 30 to 200 μ g kg⁻¹ for SDZ and 25 to 200 μ g kg⁻¹ for SMX and SPZ, precision, selectivity and sensitivity. Therefore, the validated method is clearly useful for the practical residue monitoring of the drugs evaluated in chicken samples, since its performance meets all the requirements and criteria acceptable in accordance with regulatory agency like the European Community and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil, for evaluation of residues in foods, aiming to consumers' safety.

Key-words: QuEChERS; sulphonamides determination; veterinary drugs residues; chicken breast; HPLC-DAD

1 Introduction

Sulphonamides (SAs) are antimicrobial agents most commonly used in veterinary practice to treat diseases, to control and prevent infection and to promote growth and production efficiency; they are inexpensive and offer a wide spectrum of antimicrobial activity (Biswas, Rao, Kondaiah, Anjaneyulu & Malik, 2007; Mamani, Reyes & Rath, 2009). The inappropriate or excessive use of these drugs can result in the presence of drug residue in animal tissue, which contributes to the generation of long-term health effects, including microbial antibiotic resistance, and can cause potential adverse side effects in hypersensitive individuals (ChiaoChan, Koesukwiwat, Yudthavorasit & Leepipatpiboon, 2010). Thus, many efforts, such as monitoring veterinary drug residues to ensure the safety of food, have been made to protect consumers' health.

To limit human exposure, the European Union (EU) has set maximum residue limits (MRLs) for different food contaminants in a certain number of raw foods on the basis of toxicological data, acceptable daily intake values and the performance of current analytical technology. Within the EU, one of the main document stating the MRLs of authorized veterinary drugs in food of animal origin is Council Regulation 2377/90/EC, which was repealed by Commission Regulation 470/2009 of the European Parliament and the Council (European Commission, 2009). The pharmacologically active substances that have an MRL (permitted), are contained in Regulation 37/2010 of the Council, which provides an MRL of $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for SAs in foods of animal origin, stating that the combined total residues of all substances within the sulfonamide group should not exceed this MRL value (European Commission, 2009). In Brazil, these limits are established in the Normative Instruction 14, dated May 25, 2009, from the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA, 2009).

Therefore, it is necessary to develop sensitive and easy analytical methods that can be used routinely, comply with current legislation and allow for the determination of residues of veterinary drugs in food of animal origin, thus ensuring the safety of the supplied products.

In 2002, the European Union (EU) issued a specific regulation decision (2002/657/EC) concerning the performance of methods and the interpretation of

results in the official control of residues in products of animal origin. It was mandated that some new parameters must be calculated, such as the limit of decision ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) (European Commission, 2002).

For detecting antimicrobial residues in food, bioassay techniques are widely used in screening methods because of their simplicity and low cost (Knecht, Strasser, Dietrich, Märtlbauer, Niessner & Weller, M. G., 2004; Lamar & Petz, 2007). However, before samples are condemned for containing levels of antimicrobials exceeding the stipulated levels, it is well recognized that these methods must be supported by sufficiently selective and sensitive chemical methods (Bogialli & Di Corcia, 2009). The low selectivity at the detection step created a need for highly selective sample preparation that often included lengthy extractions and clean-up procedures.

Several extraction methods have been used for SA-residue analysis; however, most of them are long and tedious, involving liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) (Koesukwiwat, Jayanta, & Leepipatpiboon, 2007), which also include an additional step to precipitate the proteins. In many instances, LLE and SPE were used in combination; for example, after deproteinization/analyte extraction by means of a suitable organic solvent and solvent removal, the extracts were subsequently purified using suitable SPE procedures (Biswas, Rao, Kondaiah, Anjaneyulu & Malik, 2007). Procedures based on matrix solid-phase dispersion have been proposed to simplify the extraction step (Kishida & Furusawa, 2001). Solid-phase microextraction (SPME) has been used for the determination of SAs in meat (Lu, Chen & Lee, 2007).

A significant step forward in reducing the time to process a sample was described in 2003: the QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) method by Anastassiades et al. for pesticide analysis. The greater diversity in the chemical properties of veterinary drugs, compared to pesticides, has made combining them into large analytical suites difficult; however, this method has been used successfully by some researchers and is always accompanied by detection based on mass spectrometry (Stubbings & Bigwood, 2009; Frenich, Aguilera-Luiz, Vidal & Romero-González, 2010). The QuEChERS method is based on an acetonitrile extraction/partitioning of the contaminants and water, and proteins are removed from the sample by salting out with sodium chloride and magnesium sulphate, followed by a dispersive-SPE clean-up, which requires the addition of small

amounts of bulk SPE packing sorbents to the extracts (Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher, & Schenk, 2003). Currently, there are no reports in the literature on the analysis of SAs using the QuEChERS method and liquid chromatography with a photodiode array detector (DAD).

Separation techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC) (Tsai, Chuang, Chen, Wu, Cheng & Huang, 2010) and capillary electrophoresis (Kowalski, Plenis, Olędzka, & Konieczna, 2011; Chu, Zhang, Wang & Ye, 2009; Mamani, Reyes & Rath, 2009), have been widely used to analyze SAs in food samples. These techniques require elaborate sample preparation procedures before quantitation to eliminate interferences from the food matrix and to concentrate the analyte. The extent of the sample preparation depends on the detection device of the chromatographic system in which the detection systems commonly used can be more or less selective and sensitive. LC has been the most frequently used instrumental technique coupled with UV, photodiode array detection (Christodoulou, Samanidou & Papadoyannis, 2007; García-Mayor, Garcinuño, Fernández-Hernando & Durand-Alegría, 2006) fluorimetric detection (Costi, Sicilia, & Rubio, 2010) and mass spectrometry (Sheridan, Policastro, Thomas & Rice, 2008).

The aim of the work was to develop and validate a method for the determination of selected veterinary antibiotics (three sulphonamides: sulphadiazine, sulphamethoxypyridazine and sulphamethoxazole) in chicken breast. The chemical structures and physicochemical properties of the studied analytes in this work are shown in Table 1. The method involves an easy extraction technique based on the QuEChERS procedure and analytical determination by a simple HPLC-DAD method, which could be applied to quality control in routine analysis.

2 Experimental

2.1 Chemicals and reagents

Analytical standards of sulphadiazine (SDZ), sulphamethoxypyridazine (SPZ) and sulphamethoxazole (SMX) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis,

MO, USA). Acetonitrile and methanol (HPLC-grade), anhydrous magnesium sulphate, sodium acetate, analytical-grade disodium hydrogenphosphate and potassium dihydrogenphosphate were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, BR), whereas phosphoric acid, acetic acid and the 25% ammonia solution (NH_4OH) were purchased from Merck-Schuchard (Munich, Germany). The primary secondary amine (PSA)-bonded silica was supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q gradient water system (Millipore, Bedford, MA, USA). OASIS HLB (N-vinylpyrrolidone/ divinylbenzene copolymer) 200 mg/5 cm^3 cartridges (Waters, Milford, MA, USA) were used for clean-up during the development of the extraction procedure.

Stock standard solutions of individual compounds (with concentrations of 1 g L^{-1}) were prepared by the exact weighing of the analytes powder and dissolved in 10 mL of methanol for SMX and SPZ; for the SDZ, the analyte powder was dissolved in 10 mL of sodium hydroxide solution (0.025 mol L^{-1}). Both solutions were then stored at -20°C in the dark. A multicomponent-working standard solution at a concentration of $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound was prepared by the appropriate dilutions of the stock solutions with methanol and stored in amber glass flasks closed at -20°C in the dark. This solution was stable for 4 weeks, after which it was replaced with a fresh solution. A buffer solution was prepared by dissolving 3.48 g of potassium dihydrogenphosphate and 1.38 g of disodium hydrogenphosphate in 500 mL of ultrapure water and diluting it to 1000 mL. The pH of the phosphate buffer was adjusted to 3.5 by adding 10% phosphoric acid solution.

2.2 Apparatus and software

Chromatographic analyses were performed using a Shimadzu system consisting of a Model LC-10ATvp pump, a Model SIL-10AF auto injector, a Model CTO-10ASvp column oven, and a Model SPD-M10Avp DAD detector. The data were analyzed with Class-vp software, taking into account the peak area of the analytes. The separation was carried out on a reverse phase octyldecylsilane C18 stainless steel column Lichrospher 60 RP, Select B, 250 mm X 4 mm, 5 μm particle size (Merck, Darmstadt, Germany), preceded by a precolumn cartridge of the same

material. The chromatographic separation was carried out with a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile:phosphate buffer (25:75, v/v), which was filtered through a 0.45- μm nylon filter with the assistance of a Millipore® support for filtration and degassed using an ultrasonic bath (Unique, Ultracleaner) before analysis. The mobile phase was monitored at a wavelength of 265 nm with a flow rate of 0.5 mL min^{-1} for 11 min, increasing by 1.2 mL min^{-1} for 17 min, followed by a re-equilibration time of 3 min at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} , for a total run time of 20 min at a column oven temperature of 40°C.

In the first step of sample preparation of the modified QuEChERS method, a high-volume centrifuge was used, while in the second step and in solid-phase extraction method, a Sigma 2-3 centrifuge was used. A Certomat (B. Braun Biotech International) vortex mixer, a pH meter, a combined glass electrode (Nova Técnica, São Paulo, Brazil), a Britania mixer and a Kern 410 analytical balance were also used.

2.3 Sample preparation

The chicken breast samples were diced into small pieces and then crushed in a mixer for 2 min at high speed; they were then deep-frozen until the analysis. For the construction of the analytical curves, samples of chicken breast purchased from local supermarkets were tested to verify the possible existence of the analyzed medications. The blank samples were fortified with the multicomponent working standard solution.

2.3.1 Modified QuEChERS method

For the modified QuEChERS method, 10 g of crushed tissue sample was taken into a 100-mL fortified glass centrifuge tube, and 15 mL of acetonitrile with 1% acetic acid was added; the mixture was vortexed for 1 min. Afterward, 6 g of anhydrous magnesium sulphate and 1.5 g of sodium acetate were added, and the

tubes were vortexed immediately for 1 min, followed by centrifugation at 680 x g for 10 min. A volume of 7 mL of the supernatant was taken and placed in a glass tube containing 175 mg of PSA and 1 g of anhydrous magnesium sulphate. The mixture was shaken manually for 30 s, and the tube was centrifuged for 15 min at 1500 x g. Following centrifugation, a 5-mL aliquot was transferred to another tube to be evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40°C. The residual was reconstituted in 1 mL of the mobile phase and centrifuged at 1500 x g for 10 min, and 100 µL was injected into the LC system.

2.3.2 Solid-phase extraction (SPE)

In order to evaluate the technique described in the item 2.3.1, the SPE, a traditional sample preparation technique, was applied in the same samples. For this purpose, the procedure was based on two procedures previously employed for the determination of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat (Biswas, Rao, Kondaiah, Anjaneyulu & Malik, 2007) and the determination of veterinary drugs in honey (Martínez-Vidal, J. L.; Aguilera-Luiz, M. M; Romero-González, R.; Garrido-Frenich, A., 2009), with some modifications. For extraction, 50 g of crushed chicken breast was taken into a 200-mL beaker, and 50 mL of ultrapure water was added. The mixture was homogenized for 2 min using a mixer. After that, 2 g of homogenate was accurately weighed in a glass tube of 15 mL by dispensing the homogenate with the help of a micropipette of 1000-5000 µL capacity. Then, 4 mL of acetonitrile was added to the sample, and the tube was held for 10 min at room temperature, vortexed at high speed for 10 min, and finally centrifuged at 1500 x g for 15 min. A volume of 4 mL of supernatant was transferred to another tube to be evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40°C. The residual was reconstituted in 1 mL of a solution of water pH 9.0:acetonitrile (75:25, v/v). It was prepared daily, adjusting the pH of the water with a sodium hydroxide solution of 0.1 mol L⁻¹, and then loaded into an OASIS HLB (200 mg) cartridge previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of ultrapure water. The cartridges were washed with 1 mL of ultrapure water and vacuum-dried for 2 min. The elution of analytes was carried out by adding sequentially 1 mL of methanol, 1 mL of acetonitrile and 1 mL of 0.12% (v/v) of 25% of

ammonia solution in methanol. The collected eluent was evaporate under a stream of nitrogen, redissolved in 0.5 mL of the mobile phase and centrifuged at 1500 x g for 10 min; finally, 100 μ L was injected into the LC system.

2.4 Method validation

For the QuEChERS method, the validation was carried out according to internationally accepted criteria (European Commission, 2002), i.e., linearity, selectivity, limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), decision limit ($CC\alpha$), detection capability ($CC\beta$), precision, recovery and accuracy. For the SPE method, the validation was carried out also according to internationally accepted criteria (European Commission, 2002), i.e., linearity, selectivity, accuracy and precision, recovery, limit of quantification (LOQ), and limit of detection (LOD). Stability and ruggedness were also evaluated.

The linearity, linear range and sensitivity were established through the analytical curve obtained by six replicates of analysis for the three analytes, using six concentration levels (30, 50, 100, 150, 175, and 200 μ g kg^{-1} for SDZ and 25, 50, 100, 150, 175, and 200 μ g kg^{-1} for SMX and SPZ) in the chicken breast matrix. Analytical curves were constructed by plotting the peak area against the concentration of each drug; they were evaluated by least squares regression analysis. The sensitivity is the slope of the calibration graph. The interference of endogenous compounds was assessed by analyzing drug-free samples and chicken breast spiked with SDZ, SPZ and SMX.

The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were determined at the signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively, measured at the approximate retention time of the corresponding analyte peak.

The critical concentrations for MRL compliance ($CC\alpha$, where $\alpha = 0.05$) were calculated from the MRL value plus 1.64 times the standard deviation of the fortified samples ($n=20$) at the MRL. The $CC\beta$ was obtained by adding $CC\alpha$ 1.64 times the same standard deviation.

Inter- and intra-day variability of the method was determined by analyzing six replicates of three samples of low, medium and high concentrations (30, 100 and

200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SDZ and 25, 100 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SMX and SPZ). The intra-day precision was evaluated on the same day ($n=6$ /each level), while the inter-day precision was evaluated on separate days ($n=6$) using different analysts. The results were expressed as the relative standard deviation (RSD, %) of peak area measurements.

For the recovery tests, SDZ, SPZ and SMX from chicken samples were measured at three levels (30, 100 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SDZ and 25, 100 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SMX and SPZ) prepared in six replicates. The efficiency of the extraction was calculated by comparing the peak areas of the analytes to those obtained by the analysis of spiked extracts of chicken blank samples, prepared as described above at the same concentration.

The accuracy of the method was determined through the recovery at three fortification levels (30, 100 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SDZ and 25, 100 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SMX and SPZ) in six replicate analyses. After extraction and chromatographic analysis, the results were compared to the theoretically added values, and the results were expressed as the relative error (%).

The SA stability was determined in the solvent (working standard solution at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and in the matrix spiked at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The stability of the stock standard solutions in methanol were analyzed for one month, and the instrumental responses were compared to the peak areas obtained at the moment of solution preparation. The chemical stability of the analytes in chicken samples was tested in the following conditions: sitting at room temperature for 8 h (bench-top stability), stored at -20°C and exposed to three freeze–thaw cycles. The extracts were tested for 24 h (auto-sampler stability). For comparison, all the stability determinations were assessed by preparing a set of freshly made samples. The analytes were considered stable if the variation of the concentrations between the assays were less than 15% of initial time response.

The method ruggedness was estimated for minor changes by means of the Youden robustness test. Three different factors (Table 2) were chosen for the entire analytical chromatographic conditions because of their possible critical influence.

3 Results and discussion

To ensure food safety, it is necessary to develop selective, sensitive, easy and inexpensive analytical methods that comply with current legislation, allow the routine, simultaneous determination of several compounds of veterinary drugs and provide accurate quantitative data. In this study, a QuEChERS technique for the determination of sulphonamides in chicken breast samples has been developed and compared with a traditional SPE technique, using a N-vinylpyrrolidone/divinylbenzene copolymer as a sorbent.

3.1 Chromatographic optimized conditions

Applying the Lichrospher 60 RP-Select B column (25 x 4.6 mm x 5 mm) at 40°C, the chromatographic separation was achieved in isocratic mode using a mobile phase constituted by phosphate buffer:acetonitrile (75:25, v/v) at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ for 11 min, increased by 1.2 mL min⁻¹ until 17 min, followed by a re-equilibration time of 3 min at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ (total run time of 20 min) and detection at 265 nm. According to the UV spectrum, 265-270 nm was the maximum absorbance of the analyzed sulphonamides. The use of the buffer with pH 3.5 in the mobile phase maintained the efficiency of the separation of the compounds (pK_a values of sulfa drugs is shown in Table 1), allowing greater interaction with the stationary phase by van der Waals forces. No interference was observed in the analytes' retention time, which was established as 10.1 minutes for SDZ, 12.7 minutes for SPZ and 16.5 minutes for SMX.

Table 3 presents the system suitability parameters, and Figure 1 shows typical chromatogram of the analytes evaluated in the present study. The theoretical plates (N) were calculated for the chromatographic column to evaluate the number of separate layers, the tailing factor (T) was a measure of the peak tailing, the resolution (Rs) described how well the species were separated, and the retention factor (k) was used to describe the migration rate of analytes on a column. These data indicated that the system was potentially suitable since the results of the test were considered

satisfactory (plate count ≥ 2000 , resolution ≥ 2.0 and tailing factor between 0.5 and 2.0) (US FDA, 1994).

Regarding robustness, the application of the Youden test consisted of the introduction of minor simultaneous changes in possible critical factors, which were chosen in the developed method according to an established experimental design with the aim of identifying the critical factors that should be controlled to obtain accurate assay results. Their selection and levels of variation are reported in Table 2. The standard deviation of the differences between two levels of each factor was then calculated, and the results obtained demonstrated that the only the variation in the % of organic solvent in the mobile phase affected the results.

3.2 Development of QuEChERS method

Traditional sample preparation for sulphonamides in animal tissues involves isolation with an organic solvent (e.g., methanol, acetonitrile, ethyl acetate), followed by SPE with polar, non-polar or ion-exchange sorbent materials (Posyniak, Zmudzki & Mitrowska, 2005). Dispersive SPE was previously used by Sergi et al. for the determination of SAs from meat (Sergi, Gentili, Perret, Marchese, Materazzi & Curini, 2007). Frenich et al. (Frenich, Aguilera-Luiz, Vidal & Romero-González, 2010) published a comparison of several techniques for veterinary drugs in eggs. Antibiotics were extracted from the samples using a buffered QuEChERS methodology.

Animal tissues are known to be rich in protein components (U.S. Department of Agriculture, 2009), which can bind to antibiotics, especially polar compounds. Therefore, an appropriate sample treatment is essential for obtaining reliable results in antibiotic analyses. Organic solvents, such as acetonitrile, methanol, and ethanol, are commonly employed in the precipitation of proteins in biological matrices. Acetonitrile typically provides high extraction efficiency and often minimizes co-extraction of lipids from animal tissues (ChiaoChan, Koesukwiwat, Yudthavorasit & Leepipatpiboon, 2010).

In Figure 2, the original (unbuffered) and the buffered QuEChERS methodologies applied in the present study can be compared. The buffered methodology with acetonitrile could be highly suitable for the extraction of

sulphonamides evaluated from chicken breast, as this solvent can precipitate proteins. After the addition of magnesium sulfate and buffering salts (pH 5-5.5), the mixture is shaken intensively and centrifuged for phase separation. An aliquot of the organic phase is cleaned up by dispersive SPE employing bulk sorbent (PSA) and MgSO_4 for the removal of residual water. The final extract can be directly employed for HPLC analysis. In the present study, the dryness step was evaluated, and it provides an increment of the recovery of the analytes (Figure 2). In view of these results, the step was included in the methodology, and the results of this parameter are presented in Table 4.

The method was linear in the range evaluated for sulphonamides in chicken breast samples (Table 4). The linear range established is satisfactory; it is able to quantify the residue values ($100 \mu\text{g Kg}^{-1}$) in accordance with the European Community (European Commission, 2002) and the Brazilian Agricultural Ministry (MAPA, 2009). In addition, the deviation of the individual points from the calibration curves was always lower than 20%. The matrix effect was also evaluated. Because the presence of matrix components can affect the analysis and the selectivity, the influence must be studied. For this purpose, the concentrations were analyzed in pure solvent and in extracted blank chicken samples, and the slopes intercept of the calibration curves were compared based on a t-test that revealed they were not statistically different (p -value higher than 5%). The selectivity was evaluated by the blank-sample analysis, and the chromatograms are shown in Figure 3.

The analytical method is able and sensitive enough to carry out residue analysis for the sulphonamides studied, as the LOD and LOQ values are ten and three times, respectively, lower than the MRLs (European Commission, 2002; MAPA, 2009).

Tests of inter- and intra-assay precision produced relative standard deviations (RSD) acceptable (Table 5) according to the European Community (European Commission, 2002), which recommends values below 15%, except for the LQ, which must be less than or equal to 20%. Accuracy can also be verified in Table 5. To evaluate the validity of the proposed method, the test was carried out at three levels, and the results can be considered satisfactory. According to the concept of the European Commission Decision 2002/657/EC, the $\text{CC}\alpha$ (decision limit) and $\text{CC}\beta$ (detection capability) have been estimated in this case for permitted veterinary drug substances. The values are presented in Table 5. With an MRL set at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$,

CC α and CC β were always lower than 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3.3 Comparison of the proposed QuEChERS method and the SPE

To compare the results obtained with the QuEChERS method, the SPE method was optimized in the laboratory. The modified procedure was based on two procedures previously employed for the determination of sulphonamides in buffalo meat (Biswas, Rao, Kondaiah, Anjaneyulu & Malik, 2007) and in honey (Martínez-Vidal, J. L.; Aguilera-Luiz, M. M; Romero-González, R.; Garrido-Frenich, A., 2009). Several solvents were tested for the conditioning, washing and elution steps. For an acceptable recovery, the sorbent was previously conditioned with methanol and ultrapure water and washed with ultrapure water. The analytes were then eluted by adding sequentially methanol, acetonitrile and 0.12% (v/v) of 25% of ammonia solution in methanol.

The linearity is demonstrated in Table 6, and the SPE procedure was sensitive enough to carry out the residue analysis for the sulphonamides studied, as the LOD and LOQ values were lower than the MRLs (European Commission, 2002; MAPA, 2009).

Tests of repeatability, recovery and accuracy of the produced results, employing the SPE methodology, are acceptable (Table 7) according to the European Community (European Commission, 2002).

When the extraction methods were compared in terms of the initial amount of sample and final concentration in the elution solvent, it can be noted that SPE provided a concentration approximately 60 times higher than the QuEChERS methodology, indicating that solid-phase extraction introduces low amounts of matrix in the chromatographic system and the effect of matrix can be minimized (Figure 3). However, the procedure is tedious and time consuming (6 samples/hour). Nevertheless, QuEChERS is a fast and inexpensive procedure, and the evaporation of the solvent permitted the concentration of the analytes in the extract with higher analytical frequency (12 samples/hour). Though the SPE method produced low values of detection and quantitation limits, by employing QuEChERS, the limits are satisfactory for the application of residue monitoring of sulphonamides.

To evaluate the stability, freeze-thaw cycles and storage at room temperature for 8 h (bench-top stability), tests were performed, and the analytes remained stable in the samples. In the extracted samples, the analytes remained stable for 24 h in the equipment auto-sampler. A 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solution stored at -20°C remained stable for one month. The analytes were considered stable in the condition evaluated if the variation in the concentrations was less than 15% of initial time response.

To evaluate the applicability of the proposed QuEChERS method, six samples from different brands and supermarkets from Alfenas (Brazil) were analyzed ($n=3/\text{sample}$). The samples were also analyzed by the SPE methodology. In both methods, none of the samples showed contamination of the sulphonamides studied at detectable levels.

4 Conclusions

A QuEChERS-HPLC-DAD method has been proposed for the simultaneous determination of sulpha compounds: sulphadiazine, sulphamethoxypyridazine and sulphamethoxazole. QuEChERS is inexpensive, fast and easy, and the extraction of the analytes of the matrix was successfully employed in chicken breast samples. In addition, the method presented linearity, precision, selectivity and sensitivity. Therefore, the validated method is clearly useful for the practical residue monitoring of the drugs evaluated in chicken samples, as all the values were within the acceptable criteria used for food safety.

Acknowledgement

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil, Capes/ Brazil and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil (processes number CDS-APQ-4487-4.04/07 and CDS-PPM-00055-09).

References

- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., & Schenk, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticides residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412-431.
- Biswas, A. K., Rao, G. S., Kondaiah, N., Anjaneyulu, A. S. R., & Malik, J. K. (2007). Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8845-8850.
- Bogialli, S., & Di Corcia, A. (2009). Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 395, 947-966.
- ChiaoChan, C., Koesukwiwat, U., Yudthavorasit, S., & Leepipatpiboon, N. (2010). Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. *Analytica Chimica Acta*, 682, 117-129.
- Christodoulou, E. A., Samanidou, V. F., & Papadoyannis, I. N. (2007). Development and validation of an HPLC confirmatory method for residue analysis of ten quinolones in tissues of various food-producing animals, according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Separation Science*, 30, 2676-2686.
- Chu, Q., Zhang, D., Wang, J., & Ye, J. (2009). Multi-residue analysis of sulphonamides in animal tissues by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2498-2504.
- Costi, E. M., Sicilia, M. D., & Rubio, S. (2010). Multiresidue analysis of sulphonamides in meat by supramolecular solvent microextraction, liquid chromatography and fluorescence detection and method validation according to the 2002/657/EC decision. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6250-6257.
- European Commission, Regulation 470/2009/EC, of 6th May (2009). Laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) n° 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) n° 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of European Communities*, L, 152, p. 11 - 22.
- European Commission, Regulation (EU) n. 37/2010, of 22th December (2009a). On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Communities*, L 15, p. 1 - 72.
- European Commission, Regulation 2002/657/EC, of 12th August (2002). Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical

methods and the interpretation of the results. *Official Journal of European Communities*, L 221 / 8-L221 / 36.

Frenich, A. G., Aguilera-Luiz, M. M., Vidal, J. L. M., & Romero-González, R. (2010). Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661, 150-160.

García-Mayor, M. A., Garcinuño, R. M., Fernández-Hernando, P., & Durand-Alegría, J. S. (2006). Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's Milk. *Journal of Chromatography A*, 1122, 76-83.

Kishida, K., & Furusawa, N. (2001). Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulphonamides in chicken. *Journal of Chromatography A*, 937, 49-55.

Knecht, B. G., Strasser, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., & Weller, M. G. (2004). Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Analytical Chemistry*, 76, 646-654.

Koesukwiwat, U., Jayanta, S., & Leepipatpiboon, N. (2007). Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulphonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk. *Journal of Chromatography A*, 1149, 102-111.

Kowalski, P., Plenis, A., Olędzka, I., & Konieczna, L. (2011). Optimization and validation of the micellar electrokinetic capillary chromatographic method for simultaneous determination of sulfonamide and amphenicol-type drugs in poultry tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, 160-167.

Lamar J., & Petz, M. (2007). Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices. *Analytica Chimica Acta*, 586, 296-303.

Lu, K. H., Chen, C. Y., & Lee, M. R. (2007). Trace determination of sulphonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 72, 1082-1087.

Mamani, M. C. V., Reyes, F. G. R., & Rath, S. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 117, 545-552.

MAPA, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil. (2009). Instruction n.14 dated May 25, 2009 – Approves the Program for Control of Residues and Contaminants in Meat (beef, poultry, swine and equine), Milk, Honey, Eggs and Fish. *Official Journal of the Union*, 28/ 05/ 2009, Section 1, p. 28.

Martínez-Vidal, J. L., Aguilera-Luiz, M. M., Romero-González, R., & Garrido-Frenich, A. (2009). Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 57, 1760-1767.

Posyniak, A., Zmudzki, J., & Mitrowska, K. (2005). Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulphonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1087, 259-264.

Sergi, M., Gentili, A., Perret, D., Marchese, S., Materazzi, S., & Curini, R. (2007). MSPD extraction of sulphonamides from meat followed by LC tandem MS determination. *Chromatographia*, 65, 757-76.

Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S., & Rice, D. (2008). Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3509-3516.

Stubbings, G., & Bigwood, T. (2009). The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, 637, 68-78.

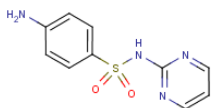
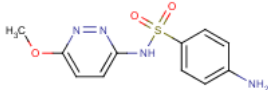
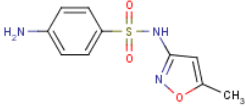
Tsai, W., Chuang, H., Chen, H., Wu, Y., Cheng, S., & Huang, T. (2010). Application of sugaring-out extraction for the determination of sulphonamides in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7812-7815.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2009). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, Nutrient Data Laboratory Home Page: www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl.

US FDA - United States Food and Drug Administration. (1994). Guidance for Industry. Validation of Chromatographic Methods.

Table 1

Chemical structure, octanol–water partition coefficients ($\log K_{ow}$) and ionization constants (pK_{a1} and pK_{a2}) for sulphonamides.

Sulphonamide antibiotic	Chemical structure	Log K_{ow}	pK_{a1}	pK_{a2}
Sulphadiazine		-0.09	1.64	6.5
Sulphamethoxypyridazine		0.32	2.18	7.19
Sulphamethoxazole		0.89	1.39	5.81

*Adapted from Costi, Sicilia & Rubio, 2010.

Table 2

Ruggedness parameters for chromatographic parameters optimized

PARAMETERS	NOMINAL VARIATION	
	(+)	(-)
Mobile phase pH	3.5	3.3
% of organic solvent in mobile phase	25	30
Column temperature (°C)	40	35

Table 3

System suitability parameters^a calculated for sulphonamides determination by the chromatographic conditions optimized

Drug	N	Rs	T	k
sulphadiazine	6248.08	0.00	1.04	9.12
sulphamethoxypyridazine	31744.44	3.22	1.00	11.68
sulphamethoxazole	38966.76	6.22	0.89	15.54

^aN= plate number; Rs= resolution; T= tailing factor; k= retention factor for the first analyte eluted.

Table 4

Linear regression data for sulphadiazine (SDZ), sulphamethoxypyridazine (SPZ) and sulphamethoxazole (SMX) limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), in chicken breast samples analysed by QuEChERS-HPLC-DAD proposed method.

Compound	Linear range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	slope	intercept	r^2 value	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SDZ	30- 200	688.42	- 3185.3	0.9929	30	13
SPZ	25- 200	351.51	4446.7	0.9924	25	10
SMX	25 -200	332.19	- 6304.6	0.9936	25	10

Table 5

Intra-day and inter-day precision, accuracy, recovery, decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) for sulphadiazine (SDZ), sulphamethoxypyridazine (SPZ) and sulphamethoxazole (SMX) in chicken breast samples analysed by QuEChERS-HPLC-DAD proposed method.

Parameter	SDZ	SPZ	SMX
Intra-day precision (RSD, %)			
30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	3.56	9.03	10.90
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10.84	6.97	8.57
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	8.56	14.09	1.90
Inter-day precision (RSD, %)			
30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	9.65	2.50	10.19
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	6.48	1.68	2.44
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	1.53	4.07	2.07
Accuracy^a (relative error, %)			
30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-8.57 (9.12)	11.48 (2.95)	+11.87 (8.03)
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	+2.08 (6.40)	+6.24 (1.74)	-5.59 (2.23)
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	+7.86 (1.52)	-4.55 (4.17)	+9.46 (2.01)
Recovery (%)			
30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	74.5	95.8	88.5
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	94.2	87.5	75.2
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	98.7	85.7	88.6
$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	104.7	103.3	110.6
$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	108.4	105.7	114.8

^a Relative standard deviation is given in brackets (n=6/ each level)

Table 6

Linear regression data for sulphadiazine (SDZ), sulphamethoxypyridazine (SPZ) and sulphamethoxazole (SMX) limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), in chicken breast samples analysed by SPE-HPLC-DAD method.

Compound	Linear range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Regression line			LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		slope	intercept	r^2 value		
SDZ	25-200	618.08	4146.5	0.9977	15	5
SPZ	25-200	563.14	169.22	0.9987	15	5
SMX	25-200	320.76	636.04	0.9965	15	5

Table 7

Intra-day precision, accuracy and recovery for sulphadiazine (SDZ), sulphamethoxy pyridazine (SPZ) and sulphamethoxazole (SMX) in chicken breast samples extracted by SPE-HPLC-DAD.

Parameter	SDZ	SPZ	SMX
Intra-day precision			
(RSD, %)			
30 µg kg ⁻¹	8.87	8.18	11.90
100 µg kg ⁻¹	5.50	1.50	14.51
200 µg kg ⁻¹	8.33	10.73	11.15
Accuracy^a			
(relative error, %)			
30 µg kg ⁻¹	-9.89 (7.55)	+4.25 (8.23)	+0.34 (12.37)
100 µg kg ⁻¹	+0.66 (5.32)	-0.14 (1.50)	+1.18 (14.65)
200 µg kg ⁻¹	+1.88 (8.24)	+1.16 (10.74)	+0.69 (11.18)
Recovery			
30 µg kg ⁻¹	57.39	69.75	63.42
100 µg kg ⁻¹	69.60	73.07	66.46
200 µg kg ⁻¹	63.42	66.46	70.90

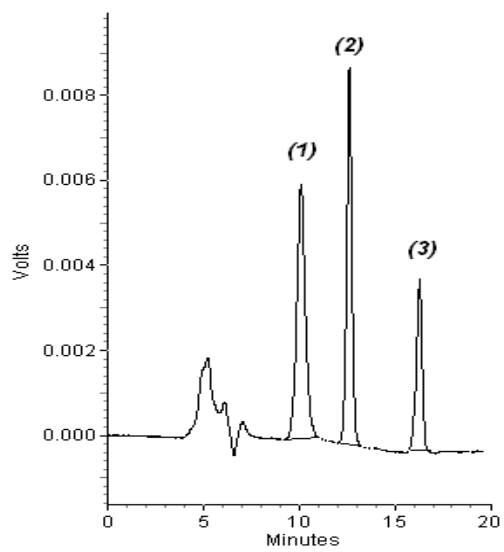
^a Relative standard deviation is given in brackets (n=6/ each level)

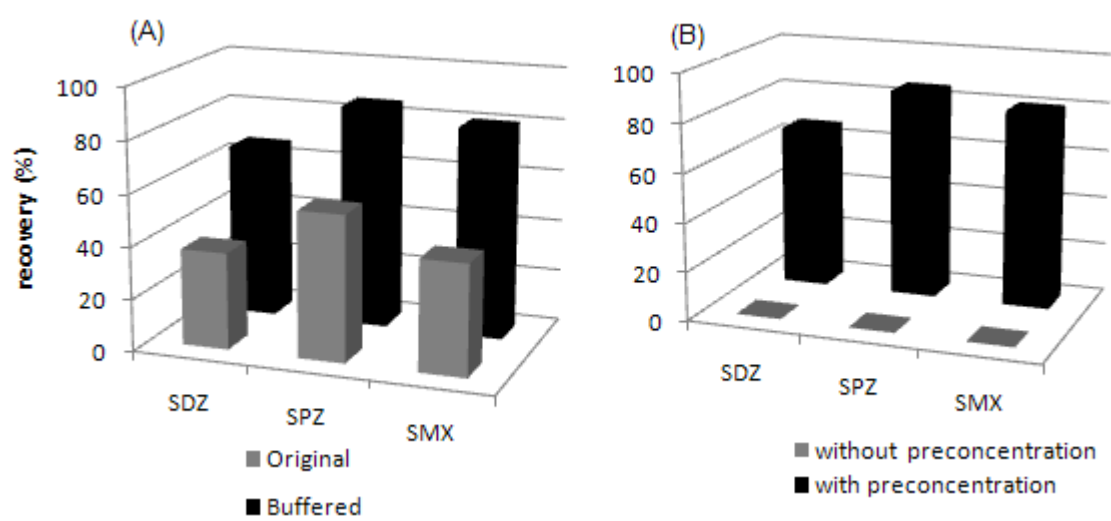
Figure captions

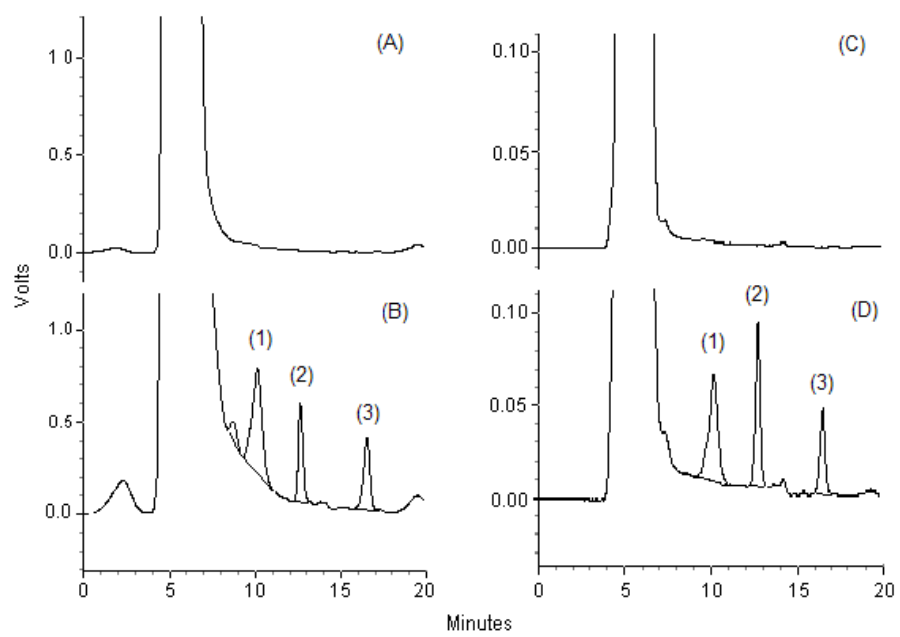
Fig. 1. Typical chromatogram of the standards solutions of the sulphonamides analysed at 200 ng mL^{-1} : (1) sulphadiazine; (2) sulphamethoxypyridazine; (3) sulphamethoxazole, in the chromatographic conditions evaluated.

Fig. 2. (A) Comparison of the original and buffered QuEChERS method in the recovery of sulphonamides. (B) Effect of preconcentration step in the QuEChERS method.

Fig. 3. Chromatograms of QuEChERS method: (A) blank chicken sample; (B) blank chicken sample fortified at $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Chromatograms of SPE method: (C) blank chicken sample and (D) blank chicken sample fortified at $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. All analysis was performed in the chromatographic conditions optimized.







5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A metodologia analítica para determinação simultânea de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) em medicamentos veterinários, empregando cromatografia líquida com detector ultravioleta, em fase reversa e eluição isocrática, proporcionou separação cromatográfica dos analitos, nas condições otimizadas. O método apresentou linearidade, com coeficiente de determinação maior que 0,999 para os dois analitos, precisão intra-ensaio, com desvio padrão relativo (DPR) variando de 0,4 a 1,0% para o SMX e entre 0,8 e 0,9% para a TMP, e precisão inter-ensaio, com variação entre 0,4 e 2,6 % para SMX e 0,9 e 3,1% para TMP. O método também apresentou exatidão, com valores entre 99,3 a 100,1%, além de robustez, sendo considerado rápido, simples e adequado para aplicação no controle de qualidade de medicamentos veterinários, uma vez que atendeu aos requisitos preconizados pelo Guia de Validação de Métodos, Resolução nº899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

- A metodologia analítica para quantificação de sulfonamidas em carne de frango, empregando cromatografia líquida com detector ultravioleta, em fase reversa e eluição isocrática, proporcionou separação cromatográfica dos analitos, nas condições otimizadas. O método apresentou seletividade e linearidade entre 30 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SDZ e de 25 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SPZ e SMX, com coeficiente de determinação maior que 0,99, para os três analitos; repetibilidade, com DPR entre 3,6 e 10,8%, para a SDZ, entre 7,0 e 14,1%, para a SPZ e entre 1,9 e 10,9%, para o SMX, e precisão intermediária, com DPR entre 1,5 e 9,7%, para a SDZ, 1,7 e 4,1% para a SPZ e entre 2,1 e 10,2%, para o SMX. A detectabilidade pode ser considerada satisfatória, uma vez que foi possível obter valores de limite de detecção de 13 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SDZ e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SPZ e SMX e de quantificação de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SDZ e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SDZ e SMX, e o limite máximo de resíduo, preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), é igual a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de CC α para os analitos foram de 104,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a SDZ, 103,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SPZ e 110,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$

¹, para o SMX, e os valores de CC β foram 108,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SDZ, 105,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a SPZ e 114,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para o SMX. Assim, o método desenvolvido pode ser considerado uma alternativa para o emprego em laboratórios analíticos, visando o monitoramento de resíduos de SMX, SPZ e SDZ em amostras de peito de frango, uma vez que seu desempenho atendeu a todos os requisitos e critérios aceitáveis, de acordo com órgãos regulatórios como a Comunidade Européia e o MAPA, contribuindo assim para a segurança do consumidor.

- A partir dos achados desse estudo, sugere-se que a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos é técnica útil na análise rotineira dos fármacos avaliados, tanto em níveis elevados, tais como os apresentados em medicamentos veterinários, quanto em níveis residuais, tais como os apresentados em amostras de peito de frango, quando devidamente validada.

REFERÊNCIAS

ACAR, J. F.; MOULIN, G. Antimicrobial resistance at farm level. **Rev. Sci. Tech.**, Paris, v. 25, p. 775 – 792, 2006.

AGUILERA – LUIZ, M. M. et al. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1205, p. 10–16, 2008.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. **Livest. Prod. Sci.**, v. 59, p. 183 – 198, 1999.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticides residues in produce. **J. AOAC Int.**, Arlington, v. 86, p. 412 – 431, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet**. Brasília, nov. 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em 14 mar. 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS (ABEF). **Relatório anual 2009/2010**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/RA_2010.pdf>. Acesso em 03 dez. 2010.

BAERT, K. et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of sulphadiazine and trimethoprim in broiler chickens. **Vet. Res. Com.**, Dordrecht, v. 27, n. 4, p. 301 – 309, 2003.

BEDOR, D. C. G. et al. Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 863, p. 46 – 54, 2008.

BISWAS, A. K. et al. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide in buffalo meat by high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food. Chem.**, Washington, v. 55, n. 22, p. 8845 – 8850, 2007.

BOGIALLI, S. et al. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamide antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food. Chem.**, Washington, v.51, p. 4225 – 4232, 2003.

BOTTEZINI, I. M. P; CORSO, M. P; VEIT, V. M. O Uso de Antibióticos na Produção de Frangos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 309, nov., 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. **Diário Oficial da União**, 18.09.2003 (2003). Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/253_03rdc.htm>. Acesso em 03 dez. 2010.

_____. _____. RE nº 899, de 29 de maio de 2003a. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 02.06.2003 (2003a). Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 13 nov. 2010.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14, de 25 de maio de 2009a. Aprova os programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, ovos e pescados para o exercício de 2009. **Diário Oficial da União**, 28.05.2009. Disponível em < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20141>>. Acesso em 13 nov. 2010.

_____. _____. Instrução Normativa nº 24, de 14 de julho de 2009b. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. **Diário Oficial da União**, 22.07.2009. Disponível em < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 20 fev. 2011.

_____. _____. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **Diário Oficial da União**, 10.07.2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000026&seqAto=000&valorAno=2009&orgao=MAPA&codigoTipo=&desItem=&desItemFim=>>>. Acesso em 13 mar. 2011.

_____. _____. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal – PNCR e os programas de controle de resíduos em carne – PCRC, mel – PCRM, leite – PCRL e pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**, 22.12.1999. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717>>. Acesso em 13 nov. 2010.

CAVAZOS-ROCHA, N. et al. Simultaneous determination and validation of antimicrobials in plasma and tissue of actinomycetoma by high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.43, p. 1775 – 1781, 2007.

CHIAOCHAN, C. et al. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 682, p. 117 – 129, 2010.

CHICO, J. et al. High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1213, p. 189 – 199, 2008.

CHRISTODOULOU, E. A.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and validation of an HPLC confirmatory method for residue analysis of ten quinolones in tissues of various food-producing animals, according to the European Union Decision 2002/657/EC. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 30, p. 2676 – 2686, 2007.

CHU, Q. et al. Multi-residue analysis of sulphonamides in animal tissues by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **J. Sci. Food Agric.**, Oxford, v. 89, p. 2498–2504, 2009.

COMUNIDADE EUROPEIA. Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia**, L 221, p. 8 – 36. Disponível em <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:PT:PDF>>. Acesso em 13 nov. 2010.

_____. Diretiva 2009/9/CE da Comissão de 10 de fevereiro de 2009. Altera a Diretiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia**, L 44, p. 10 – 61. Disponível em: <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-5/dir_2009_9/dir_2009_9_pt.pdf>. Acesso em 13 nov. 2010.

_____. Regulamento (CE) 470/2009, de 6 de maio de 2009. Prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal, que revoga o Regulamento (CEE) nº 2377/90 do Conselho e que altera a Diretiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) nº 726/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia**, L 152, p. 11 – 22. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:152:0011:0022:PT:PDF>>. Acesso em 20 fev. 2011.

_____. Regulamento nº. 37/2010 da Comissão, de 22 de dezembro de 2009 (2009a). Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximo de resíduos nos alimentos de origem animal. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia**, L 15, p. 1 – 72. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:015:0001:0072:PT:PDF>>. Acesso em 20 fev. 2011.

CÓRDOVA, M. L. F. et al. A flow injection sensor for simultaneous determination of

sulphamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C- 25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.31, p. 667 – 677, 2003.

COSTI, E. M.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Multiresidue analysis of sulphonamides in meat by supramolecular solvent microextraction, liquid chromatography and fluorescence detection and method validation according to the 2002/657/EC decision. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1217, p. 6250–6257, 2010.

DONOGHUE, D. J. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? **Poult. Sci.**, College Station, v. 82, p. 618 – 621, 2003.

EL-SAYED, M. G.; ABD EL-AZIZ, M. I.; EL-KHOLY, M. H. Kinetic behavior of sulphaquinoxaline and amprolium in chickens. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, Hannover, v. 102, n.12, p. 481 – 485, 1995.

FREITAS, A. A. R. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a detecção e quantificação da amoxicilina em músculo, por LC – MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 2008.

FRENICH, A. G. et al. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 661, p. 150 – 160, 2010.

FURUSAWA, N.; HANABUSA, R. Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. **Food Res. Int.**, Essex, v. 35, n. 1, p. 37 – 42, 2002.

GAMBA, V. et al. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 637, p. 18 – 23, 2009.

GARCÍA-MAYOR, M. A. et al. Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's Milk. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1122, p. 76 – 83, 2006.

HALLER, M. Y. et al. Quantification of veterinary antibiotics (sulphonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography – mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, New York, v.952, p. 111 – 120, 2002.

HOFF, R. **Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 03, fev. 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>.

Acesso em 14 mar. 2011.

International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **Quality Guidelines**, Q2(R1), Step 5, 6 November 1996.

Disponível em : <<http://private.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em 10 mar. 2011.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. The International Programme on Chemical Safety. **JECFA glossary of terms**. Disponível em:

<<http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/glossart.pdf>>. Acesso em 13 nov. 2010.

KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulphonamides in chicken. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 937, p. 49 – 55, 2001.

KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulphonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1149, p. 102 – 111, 2007.

KOWALSKI, P. et al. Optimization and validation of the micellar electrokinetic capillary chromatographic method for simultaneous determination of sulfonamide and amphenicol-type drugs in poultry tissue. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 54, p. 160–167, 2011.

KUENZEL, W. J. et al. Sulfamethazine advances puberty in male chicks by effecting a rapid increase in gonadotropins. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, New York, v. 137, n. 2, p. 349 – 355, 2004.

LE BOULAIRE, S.; BAUDURET, J.; ANDRE, F. Veterinary drug residues survey in meat: an HPLC method with a matrix solid phase dispersion extraction. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 45, n. 6, p. 2134 – 2142, 1997.

LEHOTAY, S. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **J. AOAC Int.**, Arlington, v. 90, p. 485 – 520, 2007.

LEHOTAY, S.; MASTOVSKA, A. R.; LIGHTFIELD, J. Use of buffering to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **J. AOAC Int.**, Arlington, v. 88, p. 615 – 629, 2005.

LOFFLIN, J. The antibiotic revolution. **Vet. Med. Us.**, Bonner Springs, v. 100, p. 12 – 19, 2005.

LÖSCHER, W. et al. Drug plasma levels following administration of trimethoprim and sulphonamide combinations to broilers. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 13, p. 309 – 319, 1990.

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

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gás chromatographic analysis and stability of multiclass pesticides residues. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1040, p. 259 – 272, 2004.

MSAGATI, T. A. M.; NINDI, M. M. Multiresidue determination of sulphonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, Oxford, v.64, p. 87 – 100, 2004.

PALERMO, J. A questão dos Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos. **Revista CFMV**, Brasília/DF, v. 7, n. 22, 2001.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte no Estado do Paraná**. Curitiba: SESA/ISEP, 2005. 25p.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1190 – 1198, 2008.

PAVLOVIC, D. M. et al. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 26, n. 11, p. 1062 – 1075, 2007.

PECORELLI, I. et al. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1032, p. 23 – 29, 2004.

PETERS, P. J. et al. Safety and toxicity of sulfadoxine/ pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. **Drug. Saf.**, Auckland, v. 30, n. 6, p. 481 – 501, 2007.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulphonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1087, p. 259 – 264, 2005.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1620 – 1634, 2009.

SHERIDAN, R. et al. Analysis and Occurrence of 14 Sulfonamide Antibacterials and Chloramphenicol in Honey by Solid-Phase Extraction Followed by LC/MS/MS Analysis. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 56, p. 3509–3516, 2008.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Classe terapêutica e espécies animais**. Disponível em <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em 13 nov. 2010.

_____. **Compêndio de produtos veterinários**. Disponível em: <<http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html>>. Acesso em 03 dez. 2010a.

SIQUEIRA, M. E. P. B. Fundamentos do preparo de amostras. In: Moreau, R. L. M. e Siqueira, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 135 – 141, 2008.

SOTO-CHINCHILLA, J. J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Analytical methods for multiresidue determination of sulphonamides and trimethoprim in meat and ground water samples by CE-MS and CE-MS/MS. **Electrophoresis**, Weinheim, v.28, p. 4164-4172, 2007.

SPENSER, E. L. Compounding, extralabel drug use, and other pharmaceutical quagmires in avian and exotics practice. **J. Exot. Pet. Med.**, Louisiana, v. 13, n. 1, p. 16 – 24, 2004.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Cien. Saude Colet.**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p. 2091 – 2106, 2009.

STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 637, p. 68 – 78, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 616-635, 1996.

TSAI, W. et al. Application of sugaring-out extraction for the determination of sulphonamides in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1217, p. 7812–7815, 2010.

UBA. União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2009**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Anuario_baixa_Resolucao.pdf>. Acesso em 03 dez. 2010.

VAN DUIJKEREN, E.; VULTO, A. G.; VAN MIERT, A. S. Trimethoprim/sulfonamide combinations in the horse: a review. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 64 – 73, 1994.