



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS



Área de concentração: Ciência de Alimentos

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO QuEChERS MODIFICADO PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFADOXINA EM LEITE POR CLAE-DAD

Autora: Lenara Oliveira Pinheiro

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2020

LENARA OLIVEIRA PINHEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO QuEChERS MODIFICADO PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFADOXINA EM LEITE POR CLAE-DAD**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2020

637.127 Pinheiro, Lenara Oliveira

P72d Desenvolvimento de um método QuEChERS modificado para determinação de sulfadoxina em leite por CLAE-DAD. / Lenara Oliveira Pinheiro. - Itapetinga: UESB, 2020.

80p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes e coorientação do Prof. D.Sc. Leandro Soares Santos.

1. Leite - Método QuEChERS. 2. Leite – Análise - Resíduo de antibiótico. 3. Cromatografia. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. III. Santos, Leandro Soares. IV. Título.

CDD(21): 637.127

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Leite - Método QuEChERS
2. Leite – Análise - Resíduo de antibiótico
3. Cromatografia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO QuEChERS MODIFICADO PARA DETERMINAÇÃO DE SULFADOXINA EM LEITE POR CLASSE.

Autor (a): LENARA OLIVEIRA PINHEIRO

Orientador (a): Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Coorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

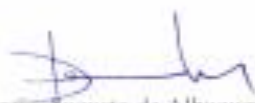
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.



Prof. Dr. Danilo Jaqueira Leão
UESB



Prof.ª Dr.ª Milena Duarte Lima
UESB



Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 19 de fevereiro de 2020.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

Ao meu pai (in memoriam)

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as bênçãos recebidas durante esse caminho.

A Nossa Senhora, fiel intercessora por passar sempre à frente de tudo.

A minha mãe, Círenia, por todo amor e incentivo para percorrer essa jornada.

Ao meu pai, Antônio (in memoriam), por me ensinar o que é importante na vida.

Aos meus irmãos, Geisa, Luana, Evanilson e Neto, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando. Amo vocês!

Ao meu namorado Mário, por todo amor e compreensão demonstrado, me acalmando nos momentos difíceis e vivendo comigo intensamente em busca desta conquista.

Ao meu orientador, professor Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, pela orientação e amizade.

Aos membros da banca, Dr. Danilo Junqueira Leão e Dr^a. Milena Duarte Lima, muito obrigada pela contribuição neste trabalho.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Leandro Soares Santos, por contribuir com tanta paciência e dedicação, ampliando meus conhecimentos e enriquecendo esta pesquisa e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

A professora Dr^a. Sibelli Passini, por todo carinho, apoio e contribuição para o desenvolvimento do projeto.

A toda equipe do Grupo de Estudos em Leite (GEL), pelo apoio, em especial a Dani e Jô, por todo carinho e incentivo.

Aos meus amigos do mestrado pelo compartilhamento de dificuldades e alegrias durante essa jornada.

Aos colegas Daniel, Henrique e Marília, pela contribuição nas análises de cromatografia.

Aos funcionários da bovinocultura, Adenilson Lima “Pelezinho” e Genilson Silva “Tim” pela coleta e incentivo, e aos funcionários do módulo de laboratórios, Gilberto e Tarcísio, por toda atenção.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

A todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xi |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 2.1 Leite: definição e qualidade..... | 16 |
| 2.2 Mastite..... | 18 |
| 2.3 Legislação para o uso de medicamentos veterinários..... | 20 |
| 2.3.1 Sulfonamidas..... | 23 |
| 2.3.2 Sulfadoxina..... | 25 |
| 2.4 Métodos de detecção de resíduos de antibióticos em leite..... | 26 |
| 2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... | 27 |
| 2.4.2 Método de extração QuEChERS..... | 29 |
| 2.5 Técnicas de planejamentos experimentais e otimização..... | 31 |
| 2.5.1 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)..... | 32 |
| 3 OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 35 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 35 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1 Reagentes e soluções..... | 36 |
| 4.2 Instrumentação e condições cromatográficas..... | 37 |
| 4.3 Desenvolvimento do método QuEChERS..... | 38 |
| 4.3.1 Obtenção da matéria prima..... | 36 |
| 4.3.2 Seleção dos sais..... | 38 |
| 4.3.3 Seleção do método de secagem da amostra..... | 39 |
| 4.3.4 Planejamento experimental..... | 39 |
| 4.3.5 Etapa de extração otimizada..... | 41 |
| 4.4 Procedimento de validação..... | 42 |
| 4.4.1 Linearidade..... | 42 |
| 4.4.2 Seletividade..... | 43 |
| 4.4.3 Precisão..... | 43 |
| 4.4.4 Exatidão..... | 43 |
| 4.4.5 Limite de detecção (LD)..... | 44 |
| 4.4.6 Limite de quantificação (LQ)..... | 44 |
| 4.5 Aplicação do método em amostras reais..... | 45 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.6 | Análises estatísticas | 45 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 5.1 | Otimização das condições cromatográficas..... | 47 |
| 5.2 | Desenvolvimento do método de extração QuEChERS | 48 |
| 5.2.1 | Teste de viabilidade do Delvotest® SP-NT | 47 |
| 5.2.2 | Seleção dos sais | 49 |
| 5.2.3 | Seleção do método de secagem da amostra..... | 51 |
| 5.2.4 | Otimização por Matriz Doehlert para duas variáveis independentes | 51 |
| 5.2.5 | Otimização por Matriz Doehlert para três variáveis independentes..... | 55 |
| 5.3 | Validação do método QuEChERS..... | 58 |
| 5.3.1 | Linearidade | 58 |
| 5.3.2 | Precisão..... | 59 |
| 5.3.3 | Exatidão..... | 60 |
| 5.3.4 | Seletividade | 60 |
| 5.3.5 | Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) | 61 |
| 5.4 | Aplicação do método em amostras reais | 62 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 64 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura química geral das sulfonamidas..... | 23 |
| Figura 2. Principais metabólitos de antibióticos sulfonamidas. | 24 |
| Figura 3. Pontos experimentais para geração de planejamentos para ajuste de modelos quadráticos: (A) planejamento Doehlert para duas variáveis e (B) três planejamentos Doehlert para otimização de três variáveis gerados pela projeção do sólido geométrico cubo octaedro no plano. | 33 |
| Figura 4. Matriz Doehlert para os níveis codificados (a) para duas variáveis, (b) para três variáveis na projeção um, (c) para três variáveis na projeção. | 34 |
| Figura 5. Esquema representando o método QuEChERS otimizado. | 42 |
| Figura 6. Cromatograma da sulfadoxina na concentração de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ com $T_R = 4,23$ minutos, utilizando-se como fase móvel (A) 78% de solução tampão acetato e (B) 22% de acetonitrila com 5% de ácido acético. | 48 |
| Figura 7. Cromatograma do leite fortificado com sulfadoxina na concentração de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ com a presença (A) e sem a presença (B) do sorvente C18 na etapa de limpeza ($T_R = 4,23$ minutos)..... | 50 |
| Figura 8. Superfície de resposta obtida da matriz Doehlert para a otimização do volume de leite e volume de acetonitrila..... | 53 |
| Figura 9. Superfície de resposta obtida da matriz Doehlert para a otimização do volume de leite e volume de acetonitrila..... | 54 |
| Figura 10. Gráficos de superfície de resposta em relação às variáveis: A) $\text{MgSO}_4 \times \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ B) $\text{MgSO}_4 \times \text{NaCl}$ e C) $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{NaCl}$ | 57 |
| Figura 11. Representação gráfica da curva analítica para a sulfadoxina. | 58 |
| Figura 12. Banda cromatográfica da amostra de leite. | 61 |
| Figura 13. Banda cromatográfica da sulfadoxina na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ na amostra de leite ($T_R = 4,23$ minutos). | 61 |
| Figura 14. Cromatograma do leite com sulfadoxina excretado das três vacas no tempo de 24 horas. | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Limites de referência para a cadeia de leite..... | 22 |
| Tabela 2. Estrutura química da sulfadoxina. | 26 |
| Tabela 3. Tratamentos testados para determinação da melhor recuperação do analito..... | 38 |
| Tabela 4. Métodos de secagem utilizados e condições experimentais..... | 39 |
| Tabela 5. Conjunto de experimentos da primeira Matriz Doehlert para dois fatores..... | 40 |
| Tabela 6. Conjunto de experimentos da segunda Matriz Doehlert para dois fatores. | 40 |
| Tabela 7. Conjunto de experimentos da Matriz Doehlert para três variáveis independentes... | 41 |
| Tabela 8. Formulação do medicamento para cada 50 mL..... | 45 |
| Tabela 9. Resultados das análises de sensibilidade do Kit Delvotest® SP-NT para diferentes concentrações de padrões de sulfadoxina..... | 47 |
| Tabela 10. Recuperações obtidas no leite fortificado com antibiótico na concentração de 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pelos dois tratamentos testados nas etapas de extração e limpeza..... | 49 |
| Tabela 11. Recuperação da sulfadoxina em leite por diferentes métodos de secagem. | 51 |
| Tabela 12. Conjunto de experimentos e resultados da primeira Matriz Doehlert para dois fatores. | 52 |
| Tabela 13. Resultados da ANOVA para a matriz Doehlert do primeiro experimento..... | 52 |
| Tabela 14. Conjunto de experimentos e resultados da Matriz Doehlert para dois fatores na segunda matriz..... | 53 |
| Tabela 15. Resultados da ANOVA para a matriz Doehlert do segundo experimento. | 54 |
| Tabela 16. Valores críticos para as duas variáveis. | 55 |
| Tabela 17. Valores otimizados com o planejamento Matriz Doehlert para duas variáveis..... | 55 |
| Tabela 18. Matriz Doehlert para três variáveis independentes com os valores reais e suas respectivas coordenadas e respostas experimentais..... | 55 |
| Tabela 19. Resultados da ANOVA para a matriz Doehlert para três variáveis independentes. | 56 |
| Tabela 20. Valores preditos para as três variáveis..... | 58 |
| Tabela 21. Valores otimizados com o planejamento Matriz Doehlert para as três variáveis... | 58 |
| Tabela 22. Análise da Variância (ANOVA) da regressão linear da sulfadoxina. | 59 |
| Tabela 23. Precisão do método analítico para determinação de sulfadoxina em leite, expressa pelo desvio padrão relativo..... | 59 |
| Tabela 24. Exatidão do método analítico para determinação de sulfadoxina em leite, expressa pela recuperação do analito. | 60 |
| Tabela 25. Resultado do limite de detecção e do limite de quantificação para sulfadoxina em leite. | 62 |

| | |
|--|----|
| Tabela 26. Contagem de Células Somáticas (CCS) para confirmação da mastite. | 62 |
| Tabela 27. Concentrações de sulfadoxina em amostras de leite de três vacas submetidas a tratamento para cura da mastite. | 62 |
| Tabela 28. Resultado das análises de sensibilidade do Kit Delvotest® SP-NT para as amostras de leite das três vacas no intervalo de tempo (horas) estudado. | 63 |

RESUMO

PINHEIRO, L. O. **Desenvolvimento de um método QuEChERS modificado para determinação de sulfadoxina em leite por CLAE-DAD.** Itapetinga-BA: UESB, 2020. 80 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).

O uso de medicamentos veterinários no tratamento de mastite em vacas leiteiras é uma prática comum nos sistemas de produção atuais. A determinação rápida e precisa de resíduos de antibióticos no leite é um desafio, devido à presença de um grande número de interferentes em sua composição. Entretanto, o método QuEChERS introduzido desde 2003, vem sendo considerado promissor na extração de diversos compostos em matrizes complexas. Objetivou-se com esse trabalho o desenvolvimento e validação de um método QuEChERS, para a extração de sulfadoxina no leite cru, seguida de quantificação empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Primeiramente, foram otimizadas as condições cromatográficas, empregando uma coluna C18 (100 mm x 46 mm, tamanho da partícula 3,5 μm), fluxo 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de 40°C, eluição isocrática com os solventes acetonitrila e solução tampão acetato, com volume de injeção 20 μL e detecção no comprimento de onda de 272 nm. Posteriormente, foi realizada a otimização da metodologia para extração da sulfadoxina, por meio de uma matriz Doehlert. Os dados obtidos foram interpretados por meio de análise de variância e regressão, ao nível de 95% de significância. No método de extração QuEChERS, o procedimento otimizado utilizou 9,69 mL de leite cru, 7,34 mL de acetonitrila com 5% de ácido acético, 3,95 g de MgSO_4 , 0,77 g de NaCl e 1,53 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. Na validação, a curva de calibração respeitou os parâmetros para ser considerada válida, os valores de DPR para repetibilidade (0,97 – 1,34 %) e reprodutibilidade (0,92 – 2,09 %) foram encontrados até 2%, a exatidão apresentou valores de recuperação entre 99,42 – 108,77 % dentro da faixa estabelecida (70 a 120 %). O LD (6,03 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e o LQ (18,30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foram menores que o limite máximo de resíduos permitido pela legislação, de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A metodologia foi aplicada em amostras de leite cru coletadas de três vacas que foram diagnosticadas com mastite e submetidas a tratamento com medicamento contendo em sua formulação sulfadoxina. Os resultados indicaram que o método proposto é eficaz para a extração de sulfadoxina em leite.

Palavras-chave: sulfadoxina, cromatografia, QuEChERS.

ABSTRACT

PINHEIRO, L. O. **Development of a modified QuEChERS method for determination of sulfadoxine in milk by HPLC-DAD.** Itapetinga-BA: UESB, 2020. 80 p. Dissertation. (Master in Engineering and Food Science, Area of Concentration in Food Science).

The use of veterinary drugs to treat mastitis in dairy cows is a common practice in current production systems. The fast and accurate determination of antibiotic residues in milk is a challenge, due to the presence of a large number of interferents in its composition. However, the QuEChERS method introduced since 2003, has been considered promising in the extraction of several compounds in complex matrices. The objective of this work was the development and validation of a QuEChERS method, for the extraction of sulfadoxine in raw milk, followed by quantification using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). First, the chromatographic conditions were optimized, using a C18 column (100 mm x 46 mm, particle size 3.5 μm), flow 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperature 40°C, isocratic elution with acetonitrile solvents and acetate buffer solution, with an injection volume of 20 μL and detection at a wavelength of 272 nm. Subsequently, the optimization of the methodology for the extraction of sulfadoxine was performed using a Doehlert matrix. The data obtained were interpreted through analysis of variance and regression, at the 95% significance level. In the QuEChERS extraction method, the optimized procedure used 9.69 ml of raw milk, 7.34 ml of acetonitrile with 5% acetic acid, 3.95 g of MgSO_4 , 0.77 g of NaCl and 1.53 g of $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. In the validation, the calibration curve respected the parameters to be considered valid, the DPR values for repeatability (0.97 - 1.34%) and reproducibility (0.92 - 2.09%) were found up to 2%, the accuracy showed recovery values between 99.42 - 108.77% within the established range (70 to 120%). LD (6.03 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and LQ (18.30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were lower than the maximum residue limit allowed by legislation, of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The methodology was applied to raw milk samples collected from three cows that were diagnosed with mastitis and subjected to treatment with a drug containing sulfadoxine in its formulation. The results indicated that the proposed method is effective for the extraction of sulfadoxine in milk.

key words: sulfadoxine, chromatography, QuEChERS.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um produto de grande importância nutricional constituído principalmente por proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais e vitaminas. A sua composição química pode ser alterada por diversos fatores, tais como espécie animal, estado nutricional dos animais, estágio de lactação e condições ambientais.

A produção de leite de alta qualidade é um fator essencial para garantir a segurança e qualidade dos produtos lácteos. A sua qualidade é determinada pela ausência de agentes físicos, químicos e biológicos, pois estes apresentam risco ao consumidor além de alterarem sua composição. Em alimentos de origem animal, tais como o leite, é comum a ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários, destacando-se os antibióticos.

No processo de controle e de cura das mastites, os antimicrobianos são bastante usados, sendo frequentemente encontrados na forma de resíduos de antibiótico no leite. A mastite é uma doença na glândula mamária dos bovinos causada principalmente por patógenos bacterianos e caracterizada pela mudança das características físico-químicas e o aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite. As mastites podem ser classificadas em clínicas e subclínicas, e, para isso, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos confiáveis para detecção da doença e classificação da gravidade.

A presença de resíduos de antibióticos no leite deve-se ao uso indiscriminado desses medicamentos e o não cumprimento do prazo de eliminação do antibiótico no leite. Assim, a presença desses resíduos de antibiótico no leite podem causar graves efeitos na saúde do consumidor, tais como alergias em indivíduos hipersensíveis, potencial carcinogênico e a rápida expansão de resistência bacteriana, acarretando ainda, efeitos indesejáveis na indústria de laticínios, por interferirem na produção de derivados.

As sulfonamidas (SAs) estão entre os medicamentos veterinários mais utilizados por serem considerados compostos antimicrobianos de amplo espectro no combater a diversos tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e pelo baixo custo de aquisição. As SAs mais utilizadas são sulfametoxazol, sulfacetamida, sulfadoxina, sulfadiazina, sulfametizol, sulfasalazina, sulfanilamida e sulfisoxazol.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por estabelecer a ingestão diária aceitável (IDA), os limites máximos de resíduos em alimentos (LMR) e as condições de uso. Para operacionalizar essa competência, a ANVISA implantou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVET) para monitorar do uso de medicamentos veterinários em animais

produtores de alimentos, sendo o leite escolhido como primeira matriz de análise, devido ao seu elevado consumo pela população.

O monitoramento de resíduos de antibióticos no leite tem sido realizado principalmente por dois tipos de métodos: triagem e confirmação. Os métodos de triagem são aplicados para indicar a possível presença de antibióticos, necessitando do acompanhamento de testes confirmatórios. Os métodos de confirmação são baseados na quantificação da concentração do analito presente na amostra, tendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como método oficial, contudo, a busca por métodos com maior velocidade analítica tem se destacado entre os pesquisadores. Nesse sentido, o método QuEChERS, tem sido utilizado para agilizar o preparo da amostra para identificação e quantificação de resíduos de antibióticos em leite, com o uso da CLAE-DAD.

A aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância para tratar grandes quantidades de dados numéricos obtidos nos experimentos, visando melhorar o desempenho do sistema. O planejamento para um experimento pode ser univariado (avalia uma variável por vez) ou multivariado, em que permite otimizar simultaneamente todas as variáveis com redução do número de experimentos e ainda realizar a avaliação da interação entre as variáveis, com menor consumo de reagentes e menor tempo gasto durante a etapa de otimização.

Baseado na importância que os resíduos de antibiótico em leite podem representar para saúde pública e para a indústria, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método QuEChERS modificado para a quantificação de sulfadoxina em leite cru, empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite: definição e qualidade

Entende-se por leite, sem outras especificações, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017). O leite é formado por uma fase aquosa contendo minerais, lactose, vitaminas hidrossolúveis e proteínas do soro, por uma fase de emulsão constituída por gordura associada a substâncias como vitaminas lipossolúveis, e por uma fase em estado de suspensão coloidal contendo caseínas ligadas a sais (RAIKOS, 2010; GUETOUACHE et al., 2014; JAISWAL et al., 2015).

O consumo de leite e produtos lácteos cresce com o aumento da população, sofrendo mudanças tanto no setor de produção quanto na distribuição, como exemplo, a formulação de novos produtos e o aumento na exportação, sendo indispensável fornecer produtos que atendam a altos padrões de qualidade. Para isso, torna-se imprescindível que o leite atenda aos seguintes parâmetros: composição nutricional completa, livre de aromas e odores desagradáveis, livre de resíduos de drogas, produtos químicos e outros adulterantes, baixa contagem de bactérias totais e baixo teor de contagem de células somáticas (MURPHY et al., 2016; RAZA et al., 2018; ALBENZIO et al., 2019).

A qualidade e segurança alimentar do leite cru podem ser afetados por diversos fatores como a saúde e alimentação animal, condições e procedimentos da ordenha, limpeza dos equipamentos, boas práticas de manuseio durante todo o processamento, controle da temperatura e do tempo durante o transporte e o armazenamento nos tanques e no silo da indústria (CERVA, 2016). Portanto, para cada etapa da produção é exigido rigoroso controle para assegurar boa qualidade físico-química e microbiológica do leite e dos produtos lácteos, uma vez que, o leite apresentando características indesejáveis ocasiona a redução na vida de prateleira e coloca em risco a saúde do consumidor (TIAN et al., 2019).

As propriedades sensoriais desejáveis são essenciais para garantir a qualidade do leite cru. A análise sensorial do leite consiste em diversos testes realizados por pessoas treinadas ou não para avaliação de atributos como o sabor e o aroma, podendo identificar através desses, problemas de manuseio antes que o leite seja processado. Existem diversos fatores que podem alterar o sabor do leite até o final do processamento, como a alimentação do animal, a fortificação do leite com vitaminas e o tipo de embalagem (CERVA, 2016; SCHIANO et al., 2017).

A adulteração também é um parâmetro que determina a qualidade do leite cru. A adulteração pode ser realizada com a adição de ingredientes externos e de baixo padrão ou ajuste de algum dos seus componentes. Alguns exemplos comuns de adulteração intencionais no leite são: adição de água para aumentar o volume, adição de ureia e melamina para aumentar o conteúdo de nitrogênio, a adição de óleos vegetais e surfactantes para alterar o conteúdo de gordura e a adição de formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito e ácido salicílico a fim de promover o aumento da vida de prateleira (GUERREIRO et al., 2018). A adulteração também pode ocorrer de forma acidental ou não intencional quando o manipulador não tem intenção de contaminar o leite (MANNING et al., 2014).

O leite contém uma ampla gama de nutrientes, o que o torna perfeito para alimentação dos indivíduos, porém, também é um meio ideal para o crescimento de micro-organismos (ISLAM et al., 2018). Os micro-organismos mais encontrados no leite são os patogênicos e os

deteriorantes. Os micro-organismos de deterioração são capazes de degradar componentes do leite como proteínas e carboidratos, tornando o alimento inadequado para o consumo humano. Os microrganismos patogênicos são causadores de intoxicação e infecção alimentar e não devem estar presentes no leite (POGHOSSIAN et al., 2019). A qualidade do leite para o consumo humano é determinada pela ausência de bactérias patogênicas, por ausência de produtos nocivos e tóxicos de bactérias e baixo número total de contagens bacterianas (ISLAM et al., 2018). Além disso, a contagem de células somáticas também é um fator determinante na qualidade do leite, sendo que, a produção dessas células é causada pela inflamação das glândulas mamárias da vaca, conhecida como mastite (TOLOSA et al., 2016).

A qualidade do leite é frequentemente prejudicada pela presença de resíduos de medicamentos veterinários que estão relacionados principalmente com a não observação do período de carência dos produtos utilizados em vacas leiteiras, para o tratamento de doenças como a mastite (KARAGEORGOU et al., 2016). O leite contaminado com resíduos de antibióticos pode causar efeitos tóxicos, reação alérgica e resistência microbiana nos consumidores. Além de interferir na fabricação de produtos lácteos, inibindo culturas lácteas (ZHAN et al., 2012).

A Instrução Normativa N° 76, de 26 de novembro de 2018, aprovou os regulamentos técnicos de identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Esse documento determina as características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas do leite, é estabelecido que o leite cru deve ser isento de substâncias estranhas a sua composição, tais como inibidores de crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico. Além de não apresentar resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites máximos previstos em normas complementares (BRASIL, 2018a).

A Instrução Normativa N° 77, de 26 de novembro de 2018, estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Os programas de autocontrole devem abordar o estado sanitário do rebanho, planos para qualificação dos fornecedores de leite, programas de seleção e capacitação de transportadores, sistemas de cadastro dos transportadores e produtores (BRASIL, 2018b).

2.2 Mastite

A mastite é a inflamação na glândula mamária caracterizada pela mudança das características físico-químicas do leite e aumento da contagem de células somáticas e pode ser

causada por bactérias (a maior prevalência), micoplasmas, fungos ou vírus (RIGGIO et al., 2015). As bactérias podem ser transmitidas entre as vacas no momento da ordenha e por patógenos presentes no ambiente (ROYSTER et al., 2015). As infecções bacterianas podem causar danos ao bem-estar e a saúde do animal, além de perdas econômicas, tais como a redução do rendimento e qualidade do leite, uso de medicamentos veterinários e menor longevidade (TESTA et al., 2017; KIM et al., 2019a).

A mastite pode se manifestar na forma clínica ou subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por sinais evidentes de inflamação como o aparecimento de grumos, aumento da temperatura animal, endurecimento da glândula mamária e alteração das características do leite. A forma subclínica caracteriza-se pela ausência de alterações visíveis no leite ou no úbere, no entanto ocorre redução da produção de leite, mudanças na composição e aumento da CCS no leite (ADKINS et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018). A mastite é mais frequentemente reconhecida em sua forma clínica, mas muitos casos são subclínicas e conseguem ser identificadas pela CCS (ROYSTER et al., 2015).

A CCS é um parâmetro para identificar as glândulas mamárias infectadas e não infectadas, representando um índice do estado de saúde do animal (ALBENZIO et al., 2019). As células somáticas do leite fazem parte do mecanismo de defesa natural, sendo constituídas de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células epiteliais mamárias, presentes normalmente no úbere bovino em baixas concentrações. Durante o processo de inflamação ocasionada por um agente patogênico, o organismo do animal reage mandando para a glândula mamária células de defesa para combater o processo de infecção. Essas células de defesa somadas as células de descamação do epitélio secretor são chamadas de células somáticas (ALBENZIO et al., 2019; BACH et al., 2019; MEHDID et al., 2019). Com base na importância da CCS sobre a qualidade do leite, o Brasil estabeleceu o limite máximo vigente de 500.000 CS/mL (média geométrica trimestral) para o leite cru refrigerado de tanque individual ou de uso comunitário (BRASIL, 2018a).

O tratamento da mastite precisa começar imediatamente após a detecção dos primeiros sinais de mastite. Para isso, é necessário ter métodos confiáveis para a detecção e classificação da gravidade da infecção. Porém, a mastite clínica normalmente ainda é detectada na ordenha, pela observação direta do leite e da glândula mamária, podendo correr o risco maior de diagnóstico errôneo entre os casos leves e moderados de mastite (WOLFE et al., 2018). Já a mastite subclínica por não ser facilmente detectável faz-se necessário a aplicação de métodos eficazes na identificação (BACH et al., 2019).

O tratamento da mastite deve ser realizado de acordo com o tipo de agente causador e, assim, decidir qual o tratamento mais adequado em cada situação (LAGO et al., 2018). Os

antimicrobianos são bastante usados para a prevenção e controle da mastite em bovinos, sendo a causa mais comum da presença de resíduos de antibiótico no leite. Apesar de que, existem programas de orientação de boas práticas para usar de forma seletiva e criteriosa os antibióticos (ROYSTER et al., 2015; MOREIRA et al., 2018; DOEHRING et al., 2019).

A escolha dos antibióticos geralmente é realizada com base em recomendações ou experiências de casos anteriores, não havendo preocupação com o patógeno responsável e seu padrão de resistência, o que determina baixa taxa de cura, resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, determinando assim, perdas econômicas ao sistema (DOEHRING et al., 2019). A forma mais apropriada de se recomendar o uso de antibióticos em casos de mastite é o uso de antibiogramas, pois assim, sabe-se qual o antibiótico eficiente para combater o agente patogênico (SPINOSA et al., 2011).

2.3 Legislação para o uso de medicamentos veterinários

Uma diversidade de compostos farmacêuticos é utilizada na medicina veterinária para o tratamento, controle e a prevenção de doenças, assim como para a promoção do crescimento de animais produtores de alimentos (TASHO et al., 2016). Esses compostos pertencem a uma variedade de categorias farmacológicas: antiparasitários (ectoparasiticidas, endectocidas, endoparasiticidas incluindo antiprotozoários e anti-helmínticos), antimicrobianos (antibióticos incluindo promotores de crescimento e antissépticos), hormônios, anestésicos, broncodilatadores (CRUZ et al., 2007), antifúngicos, anti-inflamatórios (esteroides e não esteroides), tranquilizantes, sedativos, produtos de eutanásia, antiácidos, diuréticos, eméticos e emulsionantes. Apesar de haver grandes classes terapêuticas, a prática veterinária tende a usar principalmente antibióticos, antiparasitários e hormônios esteroides (BARTIKOVA et al., 2016).

Na pecuária leiteira estima-se globalmente que os antimicrobianos representam cerca de 40% do total dos medicamentos usados em bovinos (PEREYRA et al., 2015). As substâncias antimicrobianas mais usadas são os antibióticos, drogas que podem matar ou inibir o crescimento de micro-organismos por meio de reações bioquímicas, sendo amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças bacterianas e, como aditivos alimentares para animais, mesmo não sendo o propósito de tratamento (PEREYRA et al., 2015; BARTIKOVA et al., 2016; ALBERO et al., 2018; LEE et al., 2018).

Antibióticos são compostos naturais, semi-sintéticos e sintéticos que podem ser administrados por via oral, parenteral ou tópica (MENKEM et al., 2018; BACANLI et al., 2019). A via oral é a forma mais praticada de administrar os medicamentos antimicrobianos a

animais produtores de alimentos, via ração ou água (PONTE et al., 2018). Essas drogas não são totalmente metabolizadas no organismo e conseqüentemente, uma fração significativa administrada a humanos e animais é excretada inalterada, variando de 17% a 90%, dependendo da classe do antibiótico (ALBERO et al., 2018). A meia-vida de antibióticos, ou seja, o tempo necessário para que metade do antibiótico seja inativada, varia entre alguns dias e chega até 300 dias, podendo aumentar em baixas temperaturas e no escuro (TASHO et al., 2016).

O uso indiscriminado de medicamentos veterinários e o não cumprimento do período de carência desses produtos, ou seja, o tempo necessário para que o contaminante atinja concentrações seguras no organismo do animal em tratamento, podem resultar em resíduos nos alimentos de origem animal, como a carne, o leite e os ovos, o que pode trazer danos à saúde humana. Assim, o uso dessas drogas na pecuária envolve problemas como o desenvolvimento de alergias em indivíduos hipersensíveis, potencial carcinogênico e a rápida expansão de resistência bacteriana, ameaçando a eficácia do tratamento de doenças infecciosas em humanos e animais (HOU et al., 2014; ALBERO et al., 2018). Além disso, seu controle é altamente importante para o meio ambiente, pois parte desses medicamentos excretados entra em contato com águas residuais (ZHANG et al., 2015; BERRUGA et al., 2016).

A presença de resíduos de antibióticos também é responsável por efeitos indesejáveis na indústria de laticínios, pois as bactérias utilizadas em muitos processos de fermentação são sensíveis aos antibióticos, o que resulta em deterioração das propriedades sensoriais dos produtos finais e a falha na coagulação ou maturação dos produtos lácteos. A maioria dos tratamentos térmicos empregados na indústria de laticínios não tem forte impacto sobre os resíduos de antibióticos, pois eles são resistentes à temperatura (FREITAS et al., 2013; BERRUGA et al., 2016; RAMA et al., 2017). Além disso, a atividade bactericida e bacteriostática destes compostos interfere na atividade da fosfatase alcalina e teste de redução de azul de metileno no leite (NAIK et al., 2017).

Em muitos países, as autoridades governamentais estabeleceram programas de monitoramento para determinar os níveis de antibióticos nos alimentos e estabeleceram o limite máximo de resíduo para cada classe de antibiótico. O LMR é calculado levando em consideração tanto o risco toxicológico como o possível efeito de resíduos no sistema digestivo humano (RAMA et al., 2017; MENKEM et al., 2018).

No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVET) criado pela ANVISA e o programa Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes (PNCRC) criado pelo MAPA foram ferramentas construídas com o

objetivo de avaliar e atuar na prevenção de riscos relacionados à contaminação do leite e outros alimentos por resíduos de medicamentos (ANVISA 2009; BRASIL, 1999). O PAMVET promove por meio de fiscalização e análises de amostras em todo o território nacional, o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal para o consumo humano. Enquanto o PNCRC trata-se de um programa de fiscalização que visa monitorar os sistemas de produção e a qualidade dos produtos de origem animal (ANVISA 2009; BRASIL, 1999). Brasil (2019) apresenta o plano de amostragem e os limites de referência para o PNCRC de 2019 para diferentes cadeias de produção, entre essas, o leite (Tabela 1).

Tabela 1. Limites de referência para a cadeia de leite.

| Antimicrobianos | LMR ($\mu\text{g/L}$) | Antimicrobianos | LMR ($\mu\text{g/L}$) |
|------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| Tetraciclina | 100 ¹ | Sarafloxacina | 20 |
| Sulfonamidas | 100 ¹ | Danofloxacina | 30 |
| Ácido Oxolínico | 20 | Difloxacina | 100 |
| Ácido Nalidíxico | 20 | Norfloxacina | 10 |
| Flumequina | 50 | Cloranfenicol | 0,30 ² |
| Ceftiofur | 100 | Tianfenicol | 10 |
| Cefquinoma | 20 | Florfenicol | 10 |
| Cefalônio | 20 | Azitromicina | 25 |
| Cefapirina | 60 | Enrofloxacina | 100 |
| Cefalexina | 100 | Penicilina V | 4 |
| Cefoperazona | 50 | Ciprofloxacina | 100 |
| Eritromicina | 40 | Ampicilina | 4 |
| Espiramicina | 200 | Amoxicilina | 4 |
| Lincomicina | 150 | Trimetoprim | 50 |
| Tilosina | 100 | Bromexina | 50 |
| Clindamicina | 10 | Oxacilina | 30 |
| Tilmicosina | 50 | Penicilina G | 4 |
| Cloxacilina | 30 | Nafcilina | 30 |
| Dicloxacilina | 30 | | |

¹O total combinado dos resíduos de todas as substâncias do grupo não deve ultrapassar 100 $\mu\text{g/L}$.

²O valor indicado na tabela corresponde ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) para o método analítico.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2019.

Entre o grande número de classe de antibióticos, as sulfonamidas são as substâncias mais frequentemente usadas em todo o mundo segundo Liu et al. (2018) e Yuan et al. (2019), seguidas das quinolonas (DMITRIENKO et al., 2014; HOU et al., 2014; JIANG et al., 2015).

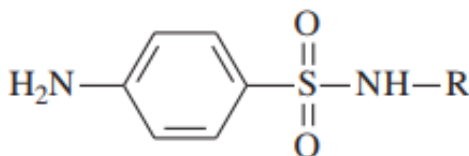
2.3.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SAs) são drogas antimicrobianas derivadas do ácido sulfanílico (ácido *p*-aminobenzenosulfônico), que atuam como agentes bacteriostáticos e possuem atividade quimioterápica significativa contra infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e alguns protozoários (ARMENTANO et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

Os antibióticos sulfonamídicos são amplamente utilizados na medicina humana e na produção animal. As SAs mais comumente utilizadas são sulfametoxazol, sulfacetamida, sulfadoxina, sulfadiazina, sulfametizol, sulfasalazina, sulfanilamida e sulfisoxazol (SONG et al., 2019).

A atividade fisiológica de SAs foi encontrada como sendo vinculada a presença de um grupo SO_2NH na estrutura química que pode ser alterada com a adição de vários radicais na posição R (Figura 1). Várias SAs são baseadas nas substâncias pirimidina, piridazina e outros heterociclos, sendo que o deslocamento do grupo para-amino para a posição meta ou orto priva o composto de sua ação bacteriostática (MWALWISI et al., 2016).

Figura 1. Estrutura química geral das sulfonamidas.

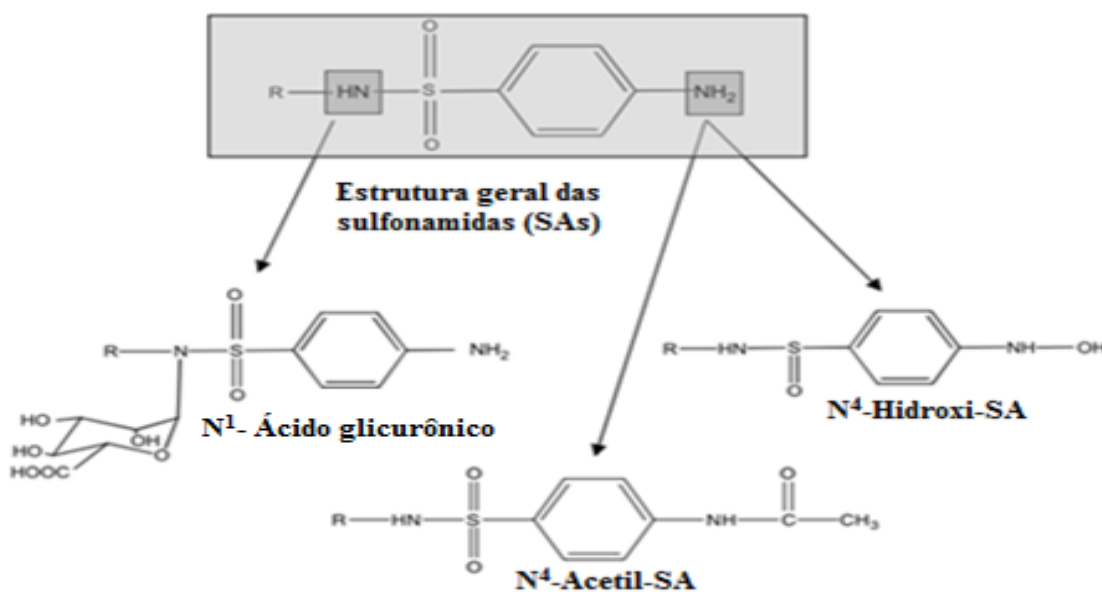


Fonte: DMITRIENKO et al., 2014.

As sulfonamidas são projetadas para atingir vias metabólicas específicas, inibindo competitivamente a conversão de ácido *p*-aminobenzoico (*p*-aminobenzoic acid - PABA), o qual é um componente essencial na síntese de ácido fólico requerido para o desenvolvimento das células bacterianas. As bactérias não têm meios de obter o ácido fólico e necessitam sintetizar este componente através de uma reação que envolve o PABA. Portanto, as SAs são quimioterápicos antimetabólicos e bacteriostáticos (BIELINKA et al., 2011; KUNG et al., 2015). Essas características do mecanismo das SAs conferem alta sensibilidade apenas a micro-organismos que sintetizam seu próprio ácido dihidrofólico (DMITRIENKO et al., 2014).

Em mamíferos, as SAs são metabolizadas principalmente no fígado, onde a estrutura química pode ser modificada, levando a formação de diversos tipos de metabólitos. A biotransformação ocorre principalmente por acetilação fase II e oxidação fase I, obtendo os derivados N4 (nitrogênio anilínico) e N1 (o nitrogênio sulfonamídico) (Figura 2) (GALAN et al., 2008).

Figura 2. Principais metabólitos de antibióticos sulfonamidas.



Fonte: Adaptado de Galan et al., 2008.

A conjugação do ácido glicurônico e hidroxilação aromática também pode ocorrer. Estes metabólitos são excretados do organismo de forma mais rápida do que o fármaco original (GALAN et al., 2008; HIBA et al., 2016; YUAN et al., 2016). Além disso, estudos mostram que alguns metabólitos antibióticos podem ser transformados em seus antibióticos parentais sob a luz solar (YUAN et al., 2019).

Durante a fase farmacodinâmica pequenas quantidades de sulfonamidas são metabolizadas imediatamente após a administração da droga e até 90% são excretadas no ambiente dentro de dois dias após a administração, sendo que, o medicamento na sua forma original é excretado na faixa de 9% a 30%, variando de acordo com a forma do fármaco e da idade e espécie animal (GALAN et al., 2008; MASZKOWSKA et al., 2013). Uma fração considerável dessas drogas é excretada através das fezes e urina devido a sua fraca absorção no intestino de humanos e animais (YANG et al., 2011; CHEN et al., 2018). As sulfonamidas também podem ser eliminadas através da saliva, suor e leite (SPINOSA et al., 2011).

As sulfonamidas são compostos polares bastante solúveis em água, cuja ionização depende do pH da matriz, proporcionando alta mobilidade para esses antibióticos

(BIELINSKA et al., 2011; HOFF et al., 2016; KARAGEORGOU et al., 2016). Por consequência, são frequentemente descarregadas em ambientes aquáticos, causando grande impacto nos ecossistemas, uma vez que as bactérias que desenvolvem resistência aos antibióticos prevalecem, representando uma ameaça futura para animais e seres humanos. Além disso, o uso em longo prazo de SAs pode resultar em resíduos em produtos de origem animal, capazes de causar efeitos adversos à saúde humana desde reações alérgicas até o surgimento de resistência microbiana (CHATZIMITAKOS et al., 2017; CHEN et al., 2018; KIM et al., 2019b). Baseado em diferentes critérios de avaliação de risco, as SAs são classificadas como nocivas ou altamente tóxicas (CHATZIMITAKOS et al., 2017).

As SAs estão entre os medicamentos veterinários mais utilizados devido à sua atividade antimicrobiana de largo espectro e custo relativamente baixo (LOPES et al., 2012; KUNG et al., 2015). Normalmente, trimetoprim e dapsona são substâncias administradas em conjunto com algumas SAs em preparações farmacêuticas, devido à atividade similar entre elas. A presença de elevados valores de sulfonamidas, dapsona e trimetoprima em produtos alimentícios é conhecida por contribuir com aumento da resistência aos antibióticos e por causar diversos efeitos adversos à saúde humana (ECONOMOU et al., 2012).

Na pecuária leiteira, a presença de resíduos de sulfonamidas deve-se ao uso extensivo desses medicamentos, prescrições não autorizadas ou falha em seguir instruções do rótulo, causando uma grande preocupação devido a sua potência carcinogênica e seu papel no desenvolvimento da resistência aos antibióticos (DMITRIENKO et al., 2015).

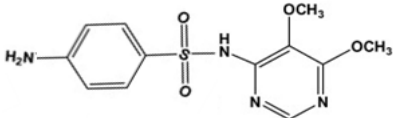
2.3.2 Sulfadoxina

Sulfadoxina é quimicamente 4-amino- *N*- (5,6-dimetoxipirimidin-4-il) – benzeno – 1 - sulfonamida, composto antifolato, ou seja, atua sinergicamente para inibir a via de biossíntese do folato, frequentemente usada em combinação com a pirimetamina para tratar ou prevenir a malária (WAHAJUDDIN et al., 2013; DIVYA et al., 2016; BARENG et al., 2018). Também é usada geralmente em combinação com outras drogas como o trimetoprim, para promover o crescimento do gado, prevenir e tratar as infecções bacterianas (SANDHIYA et al., 2014; JIA et al., 2017).

A sulfadoxina contém em sua estrutura dois grupos funcionais importantes (Tabela 2), na faixa de pH de 4 a 9, apresentando uma porção amida ácida e uma porção amina básica. O átomo de nitrogênio da amina (-NH₂) é capaz de aceitar um próton, enquanto o átomo de nitrogênio da amida (-NH) é capaz de doar um próton sob condições específicas de pH (SANDHIYA et al., 2014). A interação entre receptor droga pode ocorrer por associação

iônica, por ligação de hidrogênio e por outras forças mais fracas que podem incluir forças de transferência de carga, ou, uma combinação de vários desses tipos de força (REFAT, 2011).

Tabela 2. Estrutura química da sulfadoxina.

| Nome | Fórmula estrutural | Fórmula molecular | Massa molar |
|-------------|---|-----------------------|-------------|
| Sulfadoxina |  | $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ | 310,33 |

Fonte: Adaptado de REFAT, 2011.

O arranjo geométrico da sulfadoxina fornece ligações de hidrogênio e algum grau de solubilidade em água. O grupo SO_2NH na sulfadoxina atua como um bom local de ligação para os receptores. A presença de ligações S-N e S-O melhoram formação de uma forte rede de ligações de hidrogênio. A presença de grupos funcionais amina, amida e metoxi na sulfadoxina facilitam as interações de ligação de hidrogênio e transferência de carga com moléculas receptoras como o tetracloro-catecol, cloranil, 2,3-dicloro-5,6-diciano-1, 4-benzoquinona e ácido pícrico (SANDHIYA et al., 2014).

2.4 Métodos de detecção de resíduos de antibióticos em leite

As indústrias do leite estão entre os setores mais afetados pela presença de resíduos de antibióticos, não só pelos diversos problemas causados a saúde humana, mas também por causa das perdas econômicas derivadas do efeito inibitório desses medicamentos nos processos de fermentação como na produção de queijos e produtos lácteos (CONZUELO et al., 2012). Assim, os consumidores estão sujeitos a consumir produtos com a presença desses resíduos por não ter conhecimento sobre sua presença, sendo necessário que as autoridades de inspeção de alimentos possam garantir que o leite e produtos lácteos sejam seguros. Diferentes metodologias analíticas têm sido propostas para a identificação e quantificação dessas drogas (NEBOT et al., 2013).

Existem dois principais métodos analíticos usados na detecção de resíduos de antibióticos em leite: triagem e confirmatórios. A primeira ação no controle são os métodos de triagem, podendo ser qualitativos ou quantitativos. Um método qualitativo é usado para detectar a presença de um analito, sendo empregado principalmente o teste de inibição do crescimento microbiano. Já o método quantitativo é capaz de identificar e quantificar o analito, como as técnicas cromatográficas (GENTILI et al., 2016; GAUDIN, 2017). Os métodos de confirmação são usados em casos de resultados positivos para verificação, reconhecimento e quantificação de resíduos (AHMED et al., 2017).

Ensaio microbiológicos são baseados em uma reação específica entre um organismo suscetível e o antibiótico, apresentando diferentes vantagens como confiabilidade, relação custo - benefício, simplicidade e apenas alguns testes necessitam de tratamento com amostra (BILANDZIC et al., 2011; SONG et al., 2015; BACANLI et al., 2019). Entre os métodos microbianos, encontram-se os baseados na inibição do crescimento de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (Delvotest SP-NT, Teste Charm Blue Yellow II, teste de leite CMT-Copan) (COMUNIAN et al., 2010). O Delvotest SP-NT é um dos mais utilizados para detecção de resíduos de medicamentos veterinários no leite, por ser um teste de triagem econômico e fácil de usar, com resultados em um período relativamente curto, em torno de 3 horas (ALTHAUS et al., 2003).

Os métodos de confirmação para resíduos de antibióticos em leite são baseados principalmente em técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida micelar (RAVIOLO et al., 2007) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a diferentes detectores, como o espectrômetro de massa (YU et al., 2012; FU et al., 2019), ultravioleta (ZHANG et al., 2011; HUANG et al., 2012; KARAGEORGOU et al., 2016), fluorescência (MANZANARES et al., 2014), e o arranjo de diodos (HUANG et al., 2009). Esses métodos alcançam alta sensibilidade de detecção, no entanto, requerem pessoal treinado e laboratório adequado (NAIK et al., 2017; BACANLI et al., 2019).

2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tornou-se uma das técnicas analíticas mais utilizadas em laboratórios científicos por sua vasta aplicação na separação, quantificação e identificação de compostos. Os sistemas de CLAE são constituídos principalmente por um reservatório de solvente, bomba, injetor, coluna e detector. Os solventes (fase móvel) são bombeados através do sistema transportando a amostra e a injetando na coluna preenchida com os materiais adsorventes (fase estacionária). Os constituintes da amostra injetada migram através da coluna em diferentes velocidades e diferentes tempos, permitindo sua separação e detecção na saída usando um detector (HAGHIGHI et al., 2018; ESTEKI et al., 2019).

A CLAE tem o mecanismo de separação determinado de acordo com a escolha da fase estacionária. Existem dois principais mecanismos de separação: fase normal, a qual os analitos dividem-se entre uma fase estacionária polar e uma fase móvel de baixa polaridade e a fase reversa, onde as polaridades são invertidas, com a fase estacionária sendo menos polar que a fase móvel. Dessa forma, quando a fase estacionária é usada apropriadamente pode

separar os componentes de acordo com a natureza hidrofílica e hidrofóbica, massa molecular ou carga (FORNSTEDT et al., 2016; GIKA et al., 2016; WANG et al., 2016).

A cromatografia líquida tem mostrado ser uma técnica ideal para detectar e/ou quantificar analitos presentes em alimentos, sendo bastante usada para pesquisa de carboidratos, pesticidas e resíduos de medicamentos veterinários, além de componentes de amostras biológicas complexas. Assim, a CLAE tornou-se uma análise essencial no controle da qualidade de alimentos, investigando fraudes alimentares (GIKA et al., 2016; ESTEKI et al., 2019). De acordo com Sanchez et al (2018) a separação por CLAE acoplada ao sistema de detecção mais adequado e a análise quimiométrica adicional oferecem ferramentas potenciais para determinar a autenticidade dos alimentos.

O método de análise cromatográfica, quando desenvolvido, deve ser validado para garantir resultados confiáveis, para que possa ser aplicado rotineiramente. A vantagem da validação consiste na garantia que o método atenda as exigências mínimas de aceitação, podendo ser aplicada para o objetivo desejado (ANGEL et al., 2014).

A validação do método deve ser realizada seguindo documentos oficiais emitidos por agências reguladoras internacionais, europeias ou nacionais, além de métodos publicados por agências aprovadas e por métodos desenvolvidos em laboratórios, seguindo critérios aceitos pela comunidade científica (ALLADIO et al., 2015). Artigos de revisão também servem de orientação para a validação do método analítico. Esses documentos são úteis para qualquer validação de método, porém apenas alguns abordam especificamente a análise de drogas, venenos e seus metabólitos em fluidos corporais ou tecidos (PETERS et al., 2007).

A avaliação do método requer tempo por ser complexo, exigindo várias etapas, as quais devem levar em consideração características específicas da CLAE e a complexidade química das amostras (GOLUBOVIC et al., 2019). A ANVISA estabelece o estudo dos seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, efeito da matriz, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (ANVISA, 2017). Além desses, podem ser estudados parâmetros como sensibilidade, fidelidade, recuperação, especificidade e estabilidade (LANCAS, 2004).

A linearidade é um parâmetro que mede a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito da amostra dentro de uma faixa de calibração, o qual é formado entre as concentrações mais baixas e mais altas da substância, podendo variar de acordo com a matriz utilizada (KRUVE et al., 2015).

A seletividade consiste na capacidade do método de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que podem estar presente e interferir na sua determinação (SHAH et al 2000; PETERS et al., 2007).

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, podendo ser diferenciada do ruído do sistema. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada no experimento (LANCAS, 2004).

A precisão avalia a concordância entre ensaios independentes repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas. Já a exatidão deve ser obtida por meio do grau de concordância entre o resultado encontrado e o valor aceito como verdadeiro. E a faixa de trabalho deve ser definida de acordo com os procedimentos que se revelem satisfatórios para os parâmetros de linearidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

O preparo de amostra é uma etapa crucial no processo analítico. Diferentes métodos de extração são utilizados para a preparação e limpeza de amostras na determinação de sulfonamidas em leite, como extração líquido-líquido (LLE) (Alaburda et al., 2007; FELTRIN et al., 2007), extração em fase sólida (SPE) (LIU et al., 2011; DMITRIENKO et al., 2015) e microextração em fase sólida (SPME) (ZHENG et al., 2008). Além dessas técnicas, muitos procedimentos foram desenvolvidos, como extração de ponto de nuvem (CPE) (ZHANG et al., 2011), QuEChERS (MANZANARES et al., 2014) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (GAO et al., 2012; MANZANARES et al., 2014).

2.4.2 Método de extração QuEChERS

O método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro; do inglês, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) foi apresentado pela primeira vez no ano de 2002, por Anastassiades et al.(2003), no European Pesticide Residue Workshop (EPRW) em Roma e publicado em 2003 (ANASTASSIADES et al., 2003) e validado por Lehotay et al. (2005). O método QuEChERS é amplamente utilizado por ser uma excelente técnica de extração, possuindo várias vantagens sobre os métodos de extração tradicionais, tais como altas recuperações alcançadas, facilidade de uso, envolve menos etapas, quantidades reduzidas de amostra e solventes orgânicos, além de reduzir o uso de vidrarias no laboratório (BRAGANÇA et al., 2012; KIM et al., 2019c). Além disso, os métodos de preparação tradicional só podem quantificar a matriz de uma única amostra ou extrair o único composto alvo (WILKOWSKA et al., 2011; ZHANG et al., 2019).

O método original QuEChERS foi desenvolvido com o propósito de realizar a extração de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos com alto teor de água (frutas e vegetais), abrangendo amplo espectro de analitos, variando de pesticidas não polares a muito polares. Neste procedimento existem duas fases principais: a fase de extração e a fase de clean-up. A fase de extração, envolve a adição de 10 g de amostra, 10 mL de acetonitrila, 4 g

de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl) em um tubo de centrífuga. Esta mistura é centrifugada, ocorrendo a partição líquido-líquido entre a água presente na amostra e a acetonitrila, devido à presença dos sais, que causam o efeito *salting out*. Na segunda etapa do método, retira-se uma alíquota de 1 mL da fase sobrenadante (acetonitrila), adiciona-se 150 mg de MgSO_4 e 25 mg de sorvente de amina secundária primária. A amostra é novamente centrifugada, retirando-se uma alíquota de 0,5 mL e injetando-se no sistema cromatográfico. A etapa de limpeza envolve um procedimento de extração em fase sólida, que consiste na remoção da água residual e na etapa *clean-up* da amostra (ANASTASSIADES et al., 2003).

Desde seu desenvolvimento, o método QuEChERS tem passado por diferentes modificações e, atualmente, permite a análise de diferentes tipos de compostos orgânicos em uma grande variedade de amostras agroalimentares, ambientais e biológicas (MAYOR et al., 2019). Essa técnica tem sido aplicada para análise de vários compostos como antibióticos, micotoxinas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (KIM et al., 2019c). O QuEChERS tem demonstrado sucesso na determinação de algumas famílias de antibióticos como sulfonamidas e quinolonas, e para realização de análise de múltiplos resíduos (CURBELO et al., 2015).

As condições ótimas de extração pelo método QuEChERS são estudadas para melhorar a recuperação, simplicidade, seletividade e velocidade. As variáveis mais importantes que afetam a eficiência da extração incluem a quantidade de amostra, composição, o tipo de solvente utilizado e sua proporção em relação ao tamanho da amostra, modo de agitação, temperatura e tempo de extração, adição de sais, tipo e quantidade de solvente de limpeza (MAYOR et al., 2019).

Os solventes mais utilizados para extração de antibióticos no método QuEChERS são: acetona, acetonitrila, acetato de etila e metanol (ZHANG et al., 2019). A acetona tem maior volatilidade do que a acetonitrila, reduzindo assim, o tempo necessário para a concentração de amostra. Porém, devido a sua forte solubilidade em água é difícil separar a umidade da matriz sem usar solventes não polares. O acetato de etila é parcialmente solúvel em água e pode ser extraído sem adicionar outros solventes não polares. No entanto, para antibióticos fortemente polares, o acetato de etila não é extraído completamente da matriz aquosa. O metanol normalmente é misturado com outros solventes orgânicos com a finalidade de regular a polaridade do solvente. Destes, a acetonitrila é o mais adequado para extrair uma variedade de compostos com uma ampla gama de polaridade e é altamente compatível com os processos de análise cromatográfica (WILKOWSKA et al., 2011). Por exemplo, as sulfonamidas, que são substâncias com alta solubilidade em solventes polares e que podem ser extraídas com

acetoneitrila, devido aos seus excelentes efeitos de solvente (ZHANG et al., 2019). A acetoneitrila é miscível em água e consegue penetrar matrizes a base de água, permitindo a fácil separação das fases após adição de sal (KIM et al., 2019c).

Durante o desenvolvimento da metodologia QuEChERS são utilizados sais para promover o efeito salting-out, ou seja, separar as substâncias solúveis em água pela adição de sais. Os sais mais utilizados neste processo incluem sulfato de magnésio ($MgSO_4$), cloreto de sódio ($NaCl$), sulfato de sódio (Na_2SO_4) e citrato trissódico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$). O $NaCl$ é utilizado para ajuste de polaridade e eliminação de impurezas polares. Porém, se o $NaCl$ for adicionado em excesso pode prejudicar o efeito de separação das fases líquido-líquido (ZHANG et al., 2019). O $MgSO_4$ é o melhor sal inorgânico para promover a separação das fases líquidas, podendo reduzir o volume da fase aquosa e facilitar a distribuição de analitos para a fase orgânica e melhorar sua recuperação. A quantidade ideal de $MgSO_4$ e $NaCl$ é 4:1 na extração de resíduos de pesticida, mas não é necessariamente ideal para extração de resíduos de drogas e outros contaminantes (CURBELO et al., 2015).

Após a fase de extração a amostra em estudo pode passar por uma fase de limpeza. Nesta etapa, é utilizada uma extração em fase sólida dispersiva, apresentando como princípio o uso de adsorventes para remoção de interferentes e garantir que os compostos de interesse se mantêm na fase líquida. Os adsorventes mais utilizados incluem PSA (amina secundária primária), GCB (negro de fumo grafitado) e C18 (octadecil sílica) (ZHANG et al., 2019). O PSA tem melhor efeito de purificação, pois tem o poder de retenção de ácidos orgânicos polares, açúcares e ácidos graxos. O C18 é mais utilizado para melhorar a eficiência de limpeza em matrizes cujo teor de gordura é $\geq 2\%$, pois retém substâncias não polares, pigmentos e esteróis. O carvão ativado é utilizado para remoção de esteróis e pigmentos (ALCANTARA et al., 2019).

2.5 Técnicas de planejamentos experimentais e otimização

A otimização tem como objetivo de melhorar o desempenho do sistema analítico (processo ou produto) Durante o desenvolvimento do processo de otimização, os níveis e respostas das variáveis em função das condições geradas são investigadas (BEZERRA et al., 2019).

Os métodos de otimização de condições experimentais podem ser univariados e multivariados. O primeiro método é mais comum. Com este se avalia uma variável por vez, enquanto os níveis dos demais são mantidos em valor constante. Este método apresenta como desvantagem a necessidade da realização de muitos experimentos e, também, a falta

da avaliação das interações entre as variáveis. Por sua vez, o segundo método (multivariado) utiliza a otimização simultânea das variáveis estudadas e a redução do número de experimentos, sendo mais econômico e eficaz. Além de avaliar o efeito das interações entre as variáveis independentes (NOVAES et al., 2016).

As técnicas de otimização multivariada têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de métodos de análise de alimentos. Os procedimentos para a otimização multivariada podem ser divididas em dois tipos de planejamentos. O primeiro projeto tem como objetivo determinar quais fatores tem influência significativa sobre a resposta, sendo utilizados planejamentos fatoriais completos em dois níveis ou fatoriais fracionários. Essa triagem é importante para descartar variáveis que não contribuem para a resposta e para estabelecer uma nova etapa de otimização apenas com as variáveis de interesse. O segundo refere-se à modelagem de dados obtidos pela aplicação de uma matriz experimental específica originária da metodologia de superfície de resposta (MSR). A MSR é utilizada caso haja interesse em aprofundar os conhecimentos em relação ao processo, ou construir modelos matemáticos, utilizando-se planejamentos fatoriais completos em três níveis (NOVAES et al., 2016; FERREIRA et al., 2019).

2.5.1 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A MSR apresenta dois tipos de variáveis que devem ser reconhecidas: variáveis independentes (fatores) e variáveis dependentes (respostas). As variáveis independentes podem influenciar a resposta de um sistema, as quais são divididas em: variáveis de processo e variáveis de mistura. As variáveis de processo (como exemplo, pH e temperatura) podem alterar seus níveis de forma independente, podendo resultar em alterações do resultado experimental. Já com as variáveis de mistura (como exemplo, a porcentagem de solventes na composição da fase móvel) o resultado depende da proporção desses componentes e seus níveis não podem variar de forma independente. As variáveis dependentes (como exemplo, recuperação do analito) correspondem aos valores das propriedades medidas pela execução de experimentos definidos por uma matriz experimental e depende da combinação entre os níveis dos fatores (BEZERRA et al., 2019).

A MSR estabelece modelos quadráticos utilizados para a determinação dos valores nominais de fatores, apresentando algumas opções de planejamentos, como planejamento composto central, projeto Box Behnken, matriz de Doehlert, projeto fatorial em três níveis e projeto de mistura (FERREIRA et al., 2018). Os planejamentos mais usados para ajustar funções quadráticas são: composto central, Box Behnken e matriz de Doehlert (BEZERRA et al., 2019). Entre essas metodologias, a matriz de Doehlert apresenta vantagens, como maior

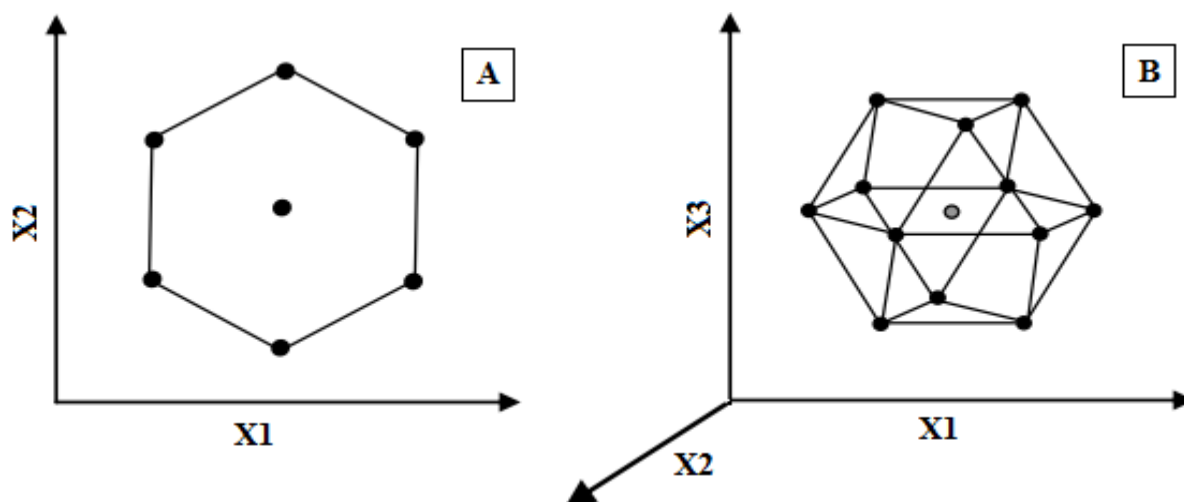
eficiência e menor número de experimentos necessários para concluir o processo de otimização (FERREIRA et al., 2004; CALDAS et al., 2013).

2.5.1.1 Matriz de Doehlert

A matriz Doehlert é um sistema de otimização de experimentos de segunda ordem, ou seja, quadrático. As formas de projeção podem mudar de acordo a quantidade de variáveis e níveis escolhidos. O número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Pode ser realizada, por exemplo, por processos com duas variáveis, apresentando entre três e cinco níveis, e, processos com três variáveis, definida com três, cinco e sete níveis. Dessa forma, por possuir números diferentes de níveis para cada variável estudada, torna-se um planejamento não rotativo, sendo uma vantagem, pois permite maior flexibilidade e conveniência na aplicação. Nos estudos realizados com a matriz Doehlert, o número de ensaios necessários é denominado (N) e os fatores (k). Assim, a construção do modelo é dada pela expressão: $N = k^2 + k + 1$ (NOVAES et al., 2016; FERREIRA et al., 2019).

A matriz Doehlert descreve um domínio circular para duas variáveis, esférico para três e hiperesférico para mais de três variáveis. Por exemplo, em um planejamento para otimização de duas variáveis consiste em um ponto central e seis pontos, formando um hexágono regular, e em três dimensões, é representando por um cubo octaedro e, dependendo da estrutura geométrica, pode gerar matrizes experimentais diferentes (Figura 3) (CALDAS et al., 2013; NOVAES et al., 2017). As matrizes do planejamento Doehlert para duas e três variáveis podem ser visualizadas na Figura 4.

Figura 3. Pontos experimentais para geração de planejamentos para ajuste de modelos quadráticos: (A) planejamento Doehlert para duas variáveis e (B) três planejamentos Doehlert para otimização de três variáveis gerados pela projeção do sólido geométrico cubo octaedro no plano.



Fonte: Adaptado de Novaes et al., 2017.

Figura 4. Matriz Doehlert para os níveis codificados (a) para duas variáveis, (b) para três variáveis na projeção um, (c) para três variáveis na projeção.

| (a) | | (b) | | | (c) | | |
|-------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|
| x_1 | x_2 | x_1 | x_2 | x_3 | x_1 | x_2 | x_3 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.866 | 1 | 0 | 0 | 0.5 | 0.866 | 0 |
| -1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.5 | 0.289 | 0.817 |
| -0.5 | -0.866 | -1 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 |
| 0.5 | -0.866 | -0.5 | -0.5 | 0.707 | -0.5 | -0.866 | 0 |
| -0.5 | 0.866 | 0.5 | -0.5 | 0.707 | -0.5 | -0.289 | -0.817 |
| | | 0.5 | 0.5 | 0.707 | 0.5 | -0.866 | 0 |
| | | -0.5 | 0.5 | 0.707 | 0.5 | -0.289 | -0.817 |
| | | -0.5 | -0.5 | -0.707 | -0.5 | 0.866 | 0 |
| | | 0.5 | -0.5 | -0.707 | 0 | 0.577 | -0.817 |
| | | 0.5 | 0.5 | -0.707 | -0.5 | 0.289 | 0.817 |
| | | -0.5 | 0.5 | -0.707 | 0 | -0.577 | 0.817 |

Fonte: Bezerra et al. (2008).

Cada modelo é definido de acordo com o número de fatores e os valores codificados da matriz experimental, sendo a relação entre os valores codificados e os reais dado pela Equação 1 (TEOFILO et al., 2006; BEZERRA et al., 2008).

$$x_i = \left(\frac{z_i - z_{i0}}{\Delta z_i} \right) \beta \quad \text{Equação 1}$$

O termo x_i é o valor codificado para o nível do fator i ; z_i é o seu valor experimental; Δz_i é a distancia entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior, β é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator.

A resposta experimental obtida a partir da matriz Doehlert fornece funções polinomiais lineares ou quadráticas que podem ser empregadas na construção de superfícies de resposta. A análise de variância (ANOVA) é a maneira mais confiável de avaliar a qualidade do modelo, em que deve apresentar regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa (TEOFILO et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo da condução desse trabalho foi o desenvolvimento e validação de metodologia analítica baseada no método QuEChERS modificado para a quantificação de sulfadoxina em leite cru, empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD).

3.2 Objetivos específicos

1. Detectar, em teste de triagem, a presença de resíduos de sulfadoxina em amostras de leite cru para o desenvolvimento do método de extração QuEChERS, utilizando-se o Kit Delvotest® SP-NT;
2. Realizar a otimização de um método QuEChERS a partir de planejamentos experimentais;
3. Analisar a eficiência do método de extração QuEChERS por análise cromatográfica de resíduos de sulfadoxina em amostras de leite cru;
4. Validar o método utilizado na quantificação dos resíduos, por meio da determinação de parâmetros analíticos apropriados, para assegurar a confiabilidade nos resultados encontrados;
5. Quantificar por CLAE-DAD os resíduos de sulfadoxina nas amostras de leite coletadas de vacas que passaram por tratamento para cura da mastite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

O padrão analítico sulfadoxina (98,0%) (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi dissolvido em metanol (Casalab, Belo Horizonte, Brasil), grau HPLC, para preparo da solução estoque na concentração de 1.10^{-6} $\mu\text{g.L}^{-1}$. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição da solução estoque em solução de Tris-HCl nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A solução estoque e as soluções de trabalho foram armazenadas em frascos âmbar, devidamente vedados, em temperatura de 4°C, até o momento da utilização.

O reagente Tris ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), ácido clorídrico (Reagen, Paraná, Brasil) e água ultrapurificada foram utilizados para o preparo da solução tampão tris (pH= 7). A solução tampão de Tris-HCl 0,1 M foi preparada com a mistura de 100 mL de solução aquosa de $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (0,1 M) e 93 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (0,1 M), ajustando o pH para 7. A mistura foi colocada num balão volumétrico de 200 mL e seu volume completado com água ultrapurificada. A solução foi armazenada sob-refrigeração (4°C).

Outros reagentes utilizados no desenvolvimento do método foram: acetonitrila com grau HPLC, acetato de amônio ($\geq 98\%$, grau analítico), sulfato de magnésio (MgSO_4) e citrato de sódio tribásico, adquiridos pela Casalab (Casalab, Belo Horizonte, Brasil). O cloreto de sódio (NaCl), tris (hidroximetil metilamina) ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), ácido clorídrico (HCl) e o ácido acético foram adquiridos da Reagen (Reagen, Paraná, Brasil). A PSA (amina secundária primária) e C18 (octadecil sílica) foram adquiridos nos laboratórios da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

A solução tampão acetato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, usada como eluente (A) da fase móvel foi preparado dissolvendo-se 1,54 g de acetato de amônio e ácido acético em água ultrapurificada. O valor do pH foi ajustado para $4,50 \pm 0,02$ com ácido acético e o volume ajustado para 1 L com água.

4.1.1 Obtenção da matéria prima

No presente trabalho, para o desenvolvimento do método de extração QuEChERS, foram utilizadas amostras de leite integral *in natura* coletadas no setor de bovinocultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), provenientes de vacas de raça holandesa que não foram submetidas a tratamento com antibióticos nos últimos 30 dias. As amostras passaram pelo teste de triagem usando o kit Delvotest® SP-NT, antes de serem utilizadas no desenvolvimento e validação do método de extração QuEChERS.

4.1.1.1 Teste de viabilidade do Delvotest® SP-NT

Para assegurar as análises de detecção de resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite foi realizado o teste de viabilidade do kit Delvotest® SP-NT (DSM Food Specialties Ingredients, Holand). O kit foi testado quanto a sua eficácia utilizando uma amostra de leite isento de resíduos de antibiótico e fortificado com diferentes concentrações de sulfadoxina (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). O resultado foi comparado com os limites de detecção especificados no boletim técnico do fabricante para esta classe de antimicrobianos.

O kit Delvotest® SP-NT permite a detecção de cinco classes de antimicrobianos: Beta-lactâmicos, Sulfonamidas, Tetraciclina, Macrolídeos e outros como a Trimetoprima e Dapsona.

4.1.1.2 Preparo das amostras para o teste de triagem

As amostras de leite coletadas foram inicialmente homogeneizadas e destinadas para o teste de triagem. Transferiu-se 0,1 mL de leite para ampolas contendo *Bacillus stearothermophilus* var. calidolactis. Em seguida, as amostras foram colocadas no incubador (Delvo® Incubator) e aquecidas a uma temperatura de $64^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por um período de 3 horas.

O resultado pode ser interpretado de acordo com a cor do ágar na parte inferior das ampolas após o tempo final de incubação requerido. Na presença de antimicrobianos, o microrganismo *Bacillus stearothermophilus* var. calidolactis é inibido e não há alteração do pH, permanecendo a cor púrpura, apresentando resultado positivo. Já na ausência de antimicrobianos detectáveis pelo teste, o microrganismo presente multiplica-se, acidificando o meio e alterando sua coloração, mudando a coloração para amarelo, apresentando resultado negativo. Quando ocorre a mudança parcial da coloração indica resultado suspeito.

4.2 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas das amostras foram realizadas utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), equipado com detector de arranjo de diodos. As condições de separação cromatográfica foram obtidas empregando uma coluna C18 (100 mm x 4,6 mm, tamanho da partícula 3,5 μm) (Agilent Technologies, São Paulo, Brasil) operando em um vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A fase móvel (A) consistiu de solução tampão acetato de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH $4,5 \pm 0,02$ e a fase (B) composta por acetonitrila. O programa de eluição consistiu de sistema isocrático com 22% de (B) e 78% de (A) por um período de 13 min. O volume de injeção foi de 20 μL e a temperatura da coluna foi ajustada

para 40°C. Uma faixa de comprimento de onda (190 - 420 nm) foi usada para adquirir espectros UV para a sulfadoxina. A sulfadoxina foi detectada a 272 nm com uma largura de banda de 4 nm, que mostrou a melhor relação sinal-ruído. O Software LC Solutions foi usado para a integração e processamento dos cromatogramas, no computador modelo Dell Vostro 220s.

4.3 Desenvolvimento do método QuEChERS

4.3.1 Seleção dos sais

A seleção da quantidade de sais e sorventes utilizados no processo de extração foi realizada testando-se dois tratamentos baseados nas metodologias de Manzanares et al. (2014) e Kim et al. (2019c), usando como critério de escolha o melhor valor de recuperação do analito na amostra. Os tratamentos apresentam o mesmo processo, diferenciando-se apenas na quantidade de sais utilizado na etapa de partição líquido-líquido e *clean up*.

O processo é iniciado com a mistura de 10 mL de leite fortificado com o antibiótico na concentração de 1000 µg.L⁻¹ com 10 mL de acetonitrila com 5% de ácido acético em um tubo falcon de 50 mL, agitando-se em vórtex por 30 segundos. Após a mistura, foram adicionados os sais para etapa de partição líquido-líquido (Tabela 3), agitando-se por 1 minuto. Esta mistura foi colocada na centrifuga (UNIVERSAL, Tuttlingen, Alemanha) a 4000 rpm por 5 minutos, ocorrendo a partição líquido-líquido entre a água presente na amostra e a acetonitrila, devido a presença dos sais, que causam o efeito *salting out*. Transferiu-se 1,5 mL do sobrenadante para um frasco para realizar a análise no CLAE sem passar pela etapa de limpeza e 6 mL do sobrenadante para etapa de *clean up*.

Tabela 3. Tratamentos testados para determinação da melhor recuperação do analito.

| Procedimento QuEChERS | Tratamento 1 | Tratamento 2 |
|--------------------------|---|---|
| | 4 g de MgSO ₄ | 4 g de MgSO ₄ |
| Partição líquido-líquido | 1 g de NaCl | 1 g de NaCl |
| | 1 g de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ | 1,5 g de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ |
| <i>Clean up</i> | 0,4 g de C18 | 0,025 g de PSA |
| | 0,4 g de PSA | 0,15 g de MgSO ₄ |
| | 1,2 g de MgSO ₄ | |

A etapa de *clean up* foi realizada com 6 mL do sobrenadante da etapa de partição líquido-líquido adicionado a um tubo de 15 mL, contendo os sais (Tabela 3), agitando-se por 2 minutos em vórtex. A amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e 1,5 mL do

sobrenadante foi transferido para um frasco e realizada a secagem por nitrogênio. Por fim, as amostras foram reconstituídas com solução de tampão tris (pH 7), agitadas no vórtex por 30 segundos e filtradas com filtro de membrana de 0,45 μm , para posterior análise cromatográfica. O leite sem adição do antibiótico também passou pela etapa de extração para verificação dos picos.

4.3.2 Seleção do método de secagem da amostra

Três métodos de secagem foram estudados para obtenção da melhor recuperação do analito: o rotaevaporador (Fisatom, São Paulo, Brasil), o concentrador (CHRIST, Osterode am Harz, Alemanha) e o gás nitrogênio. As condições experimentais estão apresentadas na Tabela 4. O experimento foi preparado utilizando-se 1,5 mL do sobrenadante obtido do processo de partição líquido-líquido das amostras de leite fortificadas com o antibiótico na concentração 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo analisadas por CLAE. A quantidade de amostra utilizada na análise com o rotaevaporador foi ajustada para 3 mL do sobrenadante, uma vez que, a quantidade de solvente na reconstituição foi a mesma, facilitando a recuperação do analito do fundo do balão chato.

Tabela 4. Métodos de secagem utilizados e condições experimentais.

| Método de secagem | Condições experimentais |
|----------------------------------|-------------------------|
| Rotaevaporador | Temperatura: 50°C |
| | Tempo: 1 - 2 minutos |
| | Rotação: 50 - 100 rpm |
| Gás nitrogênio (N ₂) | Tempo: 7 minutos |
| | Corrente suave |
| Concentrador | Temperatura: 30°C |
| | Tempo: 3 horas |
| | Rotação: 1300 rpm |

4.3.3 Planejamento experimental

Com o objetivo de aperfeiçoar as variáveis do método de extração QuEChERS e investigar as possíveis interações entre as variáveis estudadas, foi utilizado o delineamento experimental Matriz Doehlert para duas variáveis independentes (volume de leite e volume de acetonitrila) e para três variáveis independentes (MgSO₄, Na₃C₆H₅O₇ e NaCl). Os experimentos foram realizados em triplicata com repetições do ponto central para possibilitar uma estimativa de erro.

A otimização das primeiras duas variáveis experimentais (leite e acetonitrila) foi realizado utilizando a matriz Doehlert, com sete experimentos. Foram gerados duas matrizes para melhor ajustar o método. Inicialmente, foi testado o volume do leite em cinco níveis variando de 4 a 10 mL e o volume de acetonitrila variou em três níveis entre 4 a 12 mL. Na segunda matriz, foi testado o volume de leite em cinco níveis variando de 6 a 14 mL e o volume de acetonitrila variou em três níveis entre 6 e 14 mL. Os valores reais e codificados (entre parêntese) podem ser observados nas Tabelas 5 e 6, para a primeira e segunda matriz, respectivamente.

Tabela 5. Conjunto de experimentos da primeira Matriz Doehlert para dois fatores.

| Experimento | Variáveis independentes | |
|-------------|-------------------------|-------------------|
| | Leite (mL) | Acetonitrila (mL) |
| 1.1 | 6 (0) | 8 (0) |
| 1.2 | 6 (0) | 8 (0) |
| 1.3 | 6 (0) | 8 (0) |
| 2 | 10 (1) | 8 (0) |
| 3 | 8 (0.5) | 12 (0,866) |
| 4 | 2 (-1) | 8 (0) |
| 5 | 4 (-0.5) | 4 (-0,866) |
| 6 | 8 (0.5) | 4 (-0,866) |
| 7 | 4 (-0.5) | 12 (0,866) |

Ensaio 1.1, 1.2 e 1.3: Ponto central

Tabela 6. Conjunto de experimentos da segunda Matriz Doehlert para dois fatores.

| Experimento | Variáveis independentes | |
|-------------|-------------------------|-------------------|
| | Leite (mL) | Acetonitrila (mL) |
| 1.1 | 10 (0) | 10 (0) |
| 1.2 | 10 (0) | 10 (0) |
| 1.3 | 10 (0) | 10 (0) |
| 2 | 14 (1) | 10 (0) |
| 3 | 12 (0.5) | 14 (0,866) |
| 4 | 6 (-1) | 10 (0) |
| 5 | 8 (-0.5) | 6 (-0,866) |
| 6 | 12 (0.5) | 6 (-0,866) |
| 7 | 8 (-0.5) | 14 (0,866) |

Ensaio 1.1, 1.2 e 1.3: Ponto central

A otimização das três variáveis experimentais (MgSO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e NaCl) foi realizada utilizando a matriz Doehlert, com treze experimentos. A variável MgSO_4 foi testada em cinco níveis variando de 3 a 5 g, o $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ foi testado em sete níveis variando de 1 a 2 g e o NaCl variou em três níveis entre 0,5 e 1 g. Na tabela 7 estão apresentados os valores reais e codificados (entre parêntese).

Tabela 7. Conjunto de experimentos da Matriz Doehlert para três variáveis independentes.

| Experimentos | Variáveis independentes | | |
|--------------|-------------------------|---|-------------------|
| | MgSO_4 (g) | $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (g) | NaCl (g) |
| 1.1 | 4 (0) | 1,5 (0) | 0,75 (0) |
| 1.2 | 4 (0) | 1,5 (0) | 0,75 (0) |
| 1.3 | 4 (0) | 1,5 (0) | 0,75 (0) |
| 2 | 5 (1) | 1,5 (0) | 0,75 (0) |
| 3 | 4,5 (0,5) | 2 (0,866) | 0,75 (0) |
| 4 | 4,5 (0,5) | 1,67 (0,289) | 1 (0,817) |
| 5 | 3 (-1) | 1,5 (0) | 0,75 (0) |
| 6 | 3,5 (-0,5) | 1 (-0,866) | 0,75 (0) |
| 7 | 3,5 (-0,5) | 1,33(-0,289) | 0,5 (-0,817) |
| 8 | 4,5 (0,5) | 1 (-0,866) | 0,75 (0) |
| 9 | 4,5 (0,5) | 1,33 (-0,289) | 0,5 (-0,817) |
| 10 | 3,5 (-0,5) | 2 (0,866) | 0,75 (0) |
| 11 | 4 (0) | 1,83 (0,577) | 0,5 (-0,817) |
| 12 | 3,5 (-0,5) | 1,67 (0,289) | 1 (0,817) |
| 13 | 4 (0) | 1,17 (-0,577) | 1 (0,817) |

Ensaio 1.1, 1.2 e 1.3: Ponto central

4.3.4 Etapa de extração otimizada

Neste trabalho o método de extração utilizado foi o QuEChERS, em que o procedimento geral foi explicado no subcapítulo anterior. Primeiramente, as análises foram realizadas seguindo as metodologias de Manzanares et al. (2014) e Kim et al. (2019c), com algumas alterações nas quantidades dos sais utilizados, quantidade de amostra e alteração do tempo de agitação. Posteriormente, foi realizado o planejamento experimental com a matriz Doehlert para analisar a influência das variáveis (quantidades de sais, volume de amostra e volume de acetonitrila) e a condição otimizada. O procedimento geral realizado foi: adicionou-se 9,69 mL de leite em um tubo de 50 mL com fundo cônico e adicionou-se 7,34 mL de acetonitrila com 5% de ácido acético, agitando no vórtex por 1 minuto. Em seguida, o

kit de extração (3,95 g de MgSO_4 , 0,77 g de NaCl e 1,53 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) foi adicionado ao tubo e agitado no vortex por 1 min. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 min em centrífuga. Posteriormente, foram retirados 3 mL do sobrenadante e adicionados em um frasco para realizar a secagem no rotaevaporador. As amostras foram reconstituídas com 3 mL de solução tampão tris pH 7. Por fim, as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 μm , identificadas e injetadas no sistema CLAE-DAD.

A Figura 5 apresenta as etapas envolvidas após a otimização de um método QuEChERS modificado.

Figura 5. Esquema representando o método QuEChERS otimizado.



Fonte: Autora (2020).

4.4 Procedimento de validação

A análise cromatográfica da sulfadoxina foi realizada seguindo as metodologias descritas por ANVISA (2017) e Lanças (2004). A validação do método proposto consistiu na avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e seletividade.

4.4.1 Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção de uma curva analítica, relacionando as concentrações obtidas do padrão analítico em solução tampão tris (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 $\mu\text{g L}^{-1}$), analisados em triplicata, com a área obtida para cada

concentração do padrão. A linearidade foi avaliada a partir da equação da reta de regressão estimada pelo método dos mínimos quadrados e por meio do coeficiente de correlação (r).

4.4.2 Seletividade

A seletividade do método analítico pode ser comprovada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra como os componentes da matriz. Para avaliar a seletividade do método cromatográfico foram analisadas amostras de leite isentas de antibióticos para observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse. Além disso, foram fortificadas amostras de leite em diferentes concentrações (40, 100 e 160 $\mu\text{g.L}^{-1}$), a fim de demonstrar que o pico observado no tempo de retenção do analito de interesse possui apenas o componente, ou seja, é realmente o analito procurado. A seletividade também foi avaliada a partir da pureza das bandas cromatográficas.

4.4.3 Precisão

O estudo da precisão foi realizado utilizando amostras de leite isentas de contaminação, que foram enriquecidas com três concentrações diferentes de sulfadoxina: 40, 100 e 160 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em seguida, foram analisadas em seis réplicas para cada concentração. As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra padronizado. As 18 análises aconteceram em um único dia para determinação da precisão intradia, e em três dias consecutivos para a precisão interdias. A precisão foi expressa por meio da dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativa (DPR).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

DP: estimativa do desvio padrão absoluto da linha de regressão

CMD: Concentração Média determinada

4.4.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração: 40, 100 e 160 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com seis réplicas em cada nível. Esse procedimento foi realizado em um dia, com o objetivo de avaliar a exatidão intra-dia e em três diferentes dias para avaliar a exatidão inter-dias. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinação do analito

recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. O cálculo da exatidão foi feito de acordo com a Equação 4, apresentada por ANVISA (2017).

$$\text{Recuperação} = \frac{CA (\text{amostra adicionada}) - CA (\text{amostra})}{CTA} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

CA: concentração experimental do analito

CTA: concentração teórica do analito adicionado

4.4.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra, porém, não necessariamente quantificado (ANVISA, 2017). O cálculo do LD foi realizado a partir do desvio padrão médio do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próxima ao suposto limite de detecção ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). O cálculo do LD foi realizado pela Equação 1.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

σ : desvio padrão

IC: Inclinação da curva analítica

4.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi obtido a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximo ao suposto limite de detecção ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). A Equação 2 foi utilizada para calcular o valor de LQ.

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

σ : desvio padrão

IC: Inclinação da curva analítica

4.5 Aplicação do método em amostras reais

Após o desenvolvimento e validação do método de extração foram analisadas amostras de leite de três vacas que foram submetidas a tratamento após ser confirmada a mastite clínica por teste da caneca do fundo preto durante a ordenha, através da visualização da presença de grumos no leite. A confirmação da mastite também foi realizada por análise de Contagem de Células Somáticas no equipamento (Bentley Instrumente, Minnesota, Estados Unidos).

O medicamento aplicado apresenta a formulação indicada na Tabela 8. De acordo com recomendações da bula a dose injetada deve ser única e aplicada no volume de 20 – 30 mL em bovinos adultos, sendo indicado 10 a 15 mg de sulfadoxina e trimetoprim por kg de peso corpóreo. Dessa forma, considerando-se a faixa de peso dos animais foram aplicadas 25 mL por injeção em cada animal com mastite. O período de carência do medicamento utilizado foi de 24 horas.

Tabela 8. Formulação do medicamento para cada 50 mL.

| Fórmula | Concentração (g) |
|-------------|------------------|
| Sulfadoxina | 10,0 |
| Trimetoprim | 2,0 |
| Piroxicam | 0,6 |

O presente trabalho possui a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) para a utilização de animais para fins de pesquisa científica, obedecendo aos termos informados na proposta registrada com o n° 174/2018.

Amostras de leite de cada animal foram coletadas antes da aplicação do medicamento e após a aplicação, sendo coletadas no período de 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao laboratório e realizado o teste de triagem com o kit Delvotest® SP-NT. Posteriormente, as amostras foram congeladas até o momento da extração pelo método QuEChERS.

4.6 Análises estatísticas

Para os resultados dos planejamentos experimentais pela matriz Doehlert, utilizou-se o sistema Software STATISTIC versão 10.0, para análise dos dados e elaboração dos gráficos. A partir da análise de variância (ANOVA) a qualidade do ajuste dos modelos gerados foi avaliada pelo teste Fisher (teste F) por meio da significância de regressão e falta de ajuste. Os

efeitos foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi usada também, a metodologia de superfície de resposta (MSR), a qual demonstra a relação entre as variáveis estudadas.

Na validação do método, para o cálculo dos parâmetros linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, os dados foram tratados por meio do Microsoft Office Excel 2010®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de viabilidade do Delvotest® SP-NT

O teste de viabilidade realizado para o kit Delvotest® SP-NT demonstrou a eficácia do mesmo para detectar as diferentes concentrações de sulfadoxina testadas, mostrando sensibilidade do método para baixas concentrações de antimicrobianos, inclusive para concentrações abaixo do valor determinado pelo fabricante (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados das análises de sensibilidade do Kit Delvotest® SP-NT para diferentes concentrações de padrões de sulfadoxina

| Antimicrobiano | Concentrações analisadas ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Resultados |
|----------------|---|-----------------------|
| Sulfadoxina | 20 | Negativo ¹ |
| | 40 | Positivo |
| | 60 | Positivo |
| | 80 | Positivo |
| | 100 | Positivo |
| | 120 | Positivo |
| | 140 | Positivo |

¹Falso negativo.

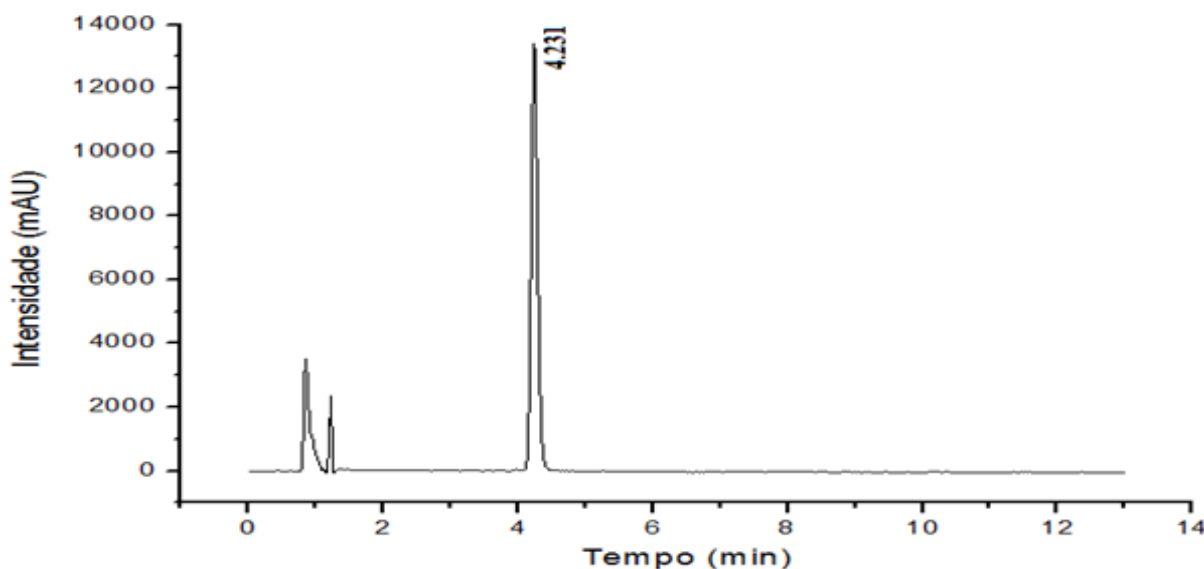
5.2 Otimização das condições cromatográficas

A otimização do método cromatográfico para a quantificação de sulfadoxina iniciaram-se com o teste de diferentes colunas e fases móveis. Primeiramente, foi testada coluna C18 de (150 mm x 46 mm, 5 μm) em diferentes fases móveis e diferentes modos isocráticos, mas não foi possível obter o pico com boa resolução e o intervalo de tempo foi mais longo. Então, foi utilizada uma nova coluna C18 (100 mm x 46 mm, 3,5 μm) e realizado novamente os testes. Iniciou-se, utilizando acetonitrila e água ultrapura, a fim de simplificá-lo. Porém, não foi obtida uma boa resolução da banda cromatográfica. Dessa forma, foi realizado um novo experimento com solução tampão de acetato (pH 4,5) e acetonitrila em diferentes concentrações para determinar o melhor sistema de eluição. O melhor sistema de eluição foi o isocrático (solução tampão de acetato/acetonitrila 78:22) com uma vazão de 1 mL.min⁻¹ e com o tempo de análise de 13 minutos. Nesta composição, os picos apresentaram-se mais simétricos, com boa resolução e seletividade.

Uma vez que a separação cromatográfica da sulfadoxina foi satisfatória para o analito em estudo, os comprimentos de onda foram testados, e assim, escolhido o comprimento de

maior absorvância (272 nm). A Figura 6 apresenta o espectro de absorção da sulfadoxina e seu tempo de retenção (T_R).

Figura 6. Cromatograma da sulfadoxina na concentração de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ com $T_R = 4.23$ minutos, utilizando-se como fase móvel (A) 78% de solução tampão acetato e (B) 22% de acetonitrila com 5% de ácido acético.



O T_R pode sofrer variação devido ao fato de que os compostos podem ser menos adsorvidos na fase estacionária com um pequeno aumento da pressão, sendo eluídos a tempos de retenção mais baixos, ou vice-versa. No entanto, antes que as análises de amostras sejam realizadas, a solução padrão permite observar com clareza os tempos de retenção da sulfadoxina, evitando possíveis erros na identificação dos picos.

Durante o processo de obtenção do melhor modo isocrático, foram testados os seguintes solventes para o preparo da solução do padrão: metanol, acetonitrila e solução tampão tris com (pH 7). As bandas cromatográficas do analito não apresentaram boa simetria quando o padrão foi solubilizado em metanol e acetonitrila, ocorrendo interferência na formação da banda. Já o cromatograma obtido por meio do preparo do padrão em solução tampão tris apresentou boa simetria (Figura 6). Dessa forma, prova-se que o uso de solventes mais fracos (mais polar) para o preparo de solução padrão e reconstituição de amostras, quando se utiliza uma coluna de fase reversa, ou seja, com fase estacionária apolar, melhora o cromatograma.

5.3 Desenvolvimento do método de extração QuEChERS

O desenvolvimento de uma metodologia eficaz para a extração da sulfadoxina em amostras de leite é uma tarefa difícil devido à complexidade do mesmo. Logo, foi

desenvolvido um método de extração capaz de obter um cromatograma do leite com picos diferentes do tempo de retenção da sulfadoxina.

No método estudado as principais condições a serem otimizadas foram: quantidade de amostra, quantidade de solvente e sais utilizados no processo de extração.

O solvente de extração escolhido foi acetonitrila com 5% de ácido acético seguindo a metodologia de Manzanares et al. (2014). A acetonitrila fornece uma extração mais eficiente e limpeza adequada devido à precipitação de proteínas e baixa solubilidade em gordura (BARRETO et al., 2019). De acordo com Arias et al. (2019), quando o ácido acético é adicionado, extratos mais limpos são obtidos, pois a presença de ácido torna a precipitação de proteínas mais eficiente. Segundo Zhang et al. (2015) as melhores recuperações encontradas para a maioria dos compostos analisados em seu trabalho, incluindo as sulfonamidas, foi quando utilizou acetonitrila acidificada com ácido acético. No presente trabalho, foi verificado que ocorreu uma adequada separação das fases e obtenção de extratos limpos utilizando a acetonitrila acidificada.

5.3.1 Seleção dos sais

A seleção dos sais utilizados no processo de extração foi realizada testando-se dois tratamentos que apresentaram o mesmo procedimento, diferenciando-se apenas na quantidade de sais utilizado, usando como critério de avaliação os melhores valores de recuperação do analito da amostra (Tabela 10).

Tabela 10. Recuperações obtidas no leite fortificado com antibiótico na concentração de 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pelos dois tratamentos testados nas etapas de extração e limpeza.

| Etapas | Recuperação (%) | |
|--------------------------|-----------------|--------------|
| | Tratamento 1 | Tratamento 2 |
| Partição líquido-líquido | 62,77 | 90,18 |
| <i>Clean up</i> | 48,98 | 70,93 |

Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações na faixa de 70 % - 120 % são aceitas (LANÇAS, 2004). Com o tratamento 2 foi observado resultados dentro da faixa aceitável de recuperação, sendo que a etapa de partição líquido-líquido alcançou maior recuperação e não apresentou interferências no tempo de retenção do pico da sulfadoxina. Dessa forma, a fase *clean up* torna-se desnecessária, uma vez que, a diminuição na recuperação foi observada após essa etapa, determinando assim, a redução no manuseio e o tempo de tratamento da amostra. Este comportamento já foi observado por Arias et al. (2019), quando estudaram a recuperação de conservantes em alimentos como queijo, utilizando o

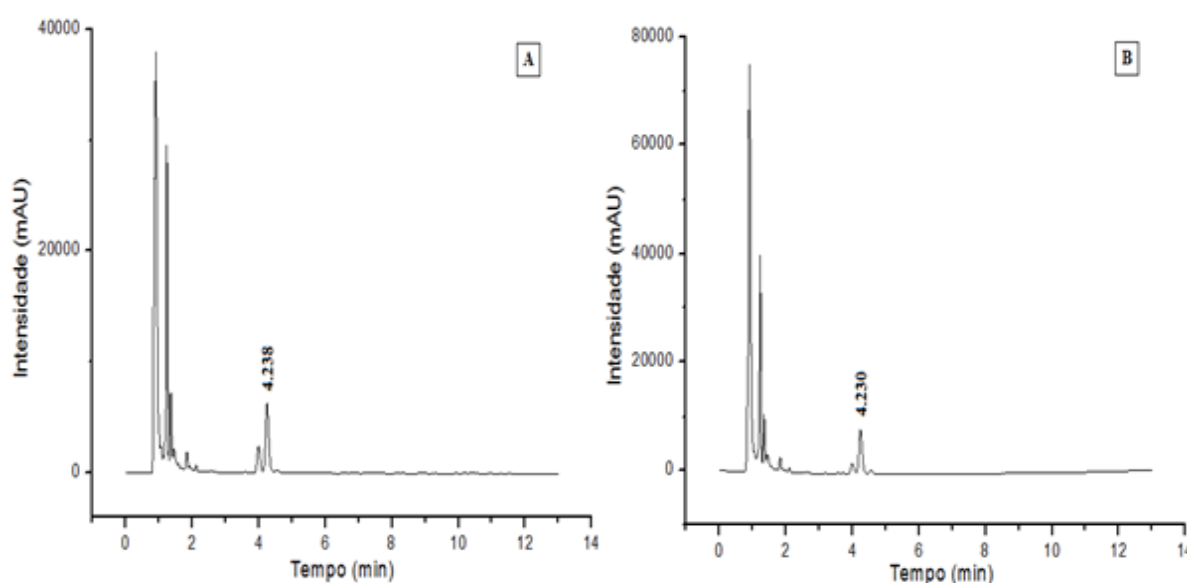
método QuEChERS, obtendo como resultado a eliminação dessa etapa no processo de extração.

O aumento da quantidade de citrato de sódio tribásico no tratamento 2, aumentou a recuperação da sulfadoxina no leite, sendo assim, esse valor foi fixado para realização das novas análises (Tabela 10). De acordo com Marchis et al. (2012) o citrato de sódio é utilizado para causar efeito tamponante (pH 5 – 5,5), o qual proporciona aumento na recuperação do analito.

As taxas de recuperação obtidas para sulfadoxina na etapa clean up utilizando PSA em combinação com $MgSO_4$ não rendeu bons resultados para este estudo. Embora o PSA tenha o poder de retenção de ácidos orgânicos, açúcares e ácidos graxos, resultando em extratos incolores e com menores interferências nos picos da matriz, observou-se que o aumento de PSA juntamente com os outros sais na etapa de limpeza, diminuiu os valores de recuperação da sulfadoxina.

O adsorvente C18 foi adicionado no primeiro tratamento (Tabela 10) para analisar sua melhoria na eficiência do processo de limpeza, por remover interferências apolares geradas pela matriz. A partir dos dois cromatogramas obtidos com a presença do C18 (tratamento 1) e sem a presença (tratamento 2) (Figura 7), pode-se observar que o uso do sorvente C18 torna-se dispensável, já que os picos do leite não apresentaram interferências com a banda cromatográfica da sulfadoxina sem o uso do C18.

Figura 7. Cromatograma do leite fortificado com sulfadoxina na concentração de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ com a presença (A) e sem a presença (B) do sorvente C18 na etapa de limpeza ($T_R = 4,23$ minutos).



5.3.2 Seleção do método de secagem da amostra

O processo de secagem das amostras é realizado após o processo de extração para eliminação do solvente acetonitrila, uma vez que, esse solvente interfere na formação da banda cromatográfica da sulfadoxina.

Neste trabalho, foram estudados três tipos de processos de secagem (rotaevaporador, concentrador e gás nitrogênio) para obtenção da melhor recuperação do analito, com as condições experimentais apresentadas na Tabela 4.

A Tabela 11 apresenta os resultados das recuperações obtidas para cada método de secagem. A secagem realizada no rotaevaporador foi melhor em relação aos outros dois métodos e, devido a isso, foi escolhido como processo de secagem para a validação do método de extração QuEChERS.

Tabela 11. Recuperação da sulfadoxina em leite por diferentes métodos de secagem.

| Método de secagem | Recuperação (%) |
|----------------------------------|---------------------------|
| | 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ |
| Concentrador | 43,68 |
| Rotaevaporador | 90,89 |
| Gás nitrogênio (N ₂) | 87,35 |

Em resumo, os resultados obtidos nestes primeiros ensaios para o desenvolvimento do método foram satisfatórios. Porém, foi decidido realizar um planejamento experimental para estudar a influência de cada variável no método QuEChERS e melhorar os resultados.

5.3.3 Otimização por Matriz Doehlert para duas variáveis independentes

A matriz Doehlert foi utilizado inicialmente para definir os valores ótimos das variáveis volume de leite e volume de acetonitrila. Os níveis para a montagem da matriz Doehlert foram escolhidos tendo em vista, os experimentos de triagem e a revisão bibliográfica realizada.

Os resultados obtidos a partir das condições da Matriz Doehlert para as duas variáveis experimentais estudadas podem ser observados na Tabela 12. Os valores das respostas são o resultado médio da triplicata da recuperação do analito.

Tabela 12. Conjunto de experimentos e resultados da primeira Matriz Doehlert para dois fatores.

| Experimento | Variáveis independentes | | Recuperação (%) |
|-------------|-------------------------|-------------------|-----------------|
| | Leite (mL) | Acetonitrila (mL) | |
| 1.1 | 6 (0) | 8 (0) | 70,06 |
| 1.2 | 6 (0) | 8 (0) | 65,13 |
| 1.3 | 6 (0) | 8 (0) | 67,30 |
| 2 | 10 (1) | 8 (0) | 100,43 |
| 3 | 8 (0,5) | 12 (0,866) | 54,87 |
| 4 | 2 (-1) | 8 (0) | 23,10 |
| 5 | 4 (-0,5) | 4 (-0,866) | 66,78 |
| 6 | 8 (0,5) | 4 (-0,866) | 21,35 |
| 7 | 4 (-0,5) | 12 (0,866) | 28,48 |

O modelo de regressão foi avaliado com o objetivo de estimar a sua capacidade preditiva. Esta avaliação foi realizada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 13. A falta de ajuste foi observada, indicando que o modelo não se ajustou bem aos resultados.

Tabela 13. Resultados da ANOVA para a matriz Doehlert do primeiro experimento.

| | SS ^a | df ^a | MS | F | p ^b |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| (1) Leite (mL) (L) | 1533,015 | 1 | 1533,015 | 250,7667 | 0,003964 |
| Leite (mL) (Q) | 39,436 | 1 | 39,436 | 6,4508 | 0,126308 |
| (2) Acetonitrila (mL) (L) | 5,694 | 1 | 5,694 | 0,9314 | 0,436321 |
| Acetonitrila (mL) (Q) | 1147,713 | 1 | 1147,713 | 187,7400 | 0,005284 |
| 1L por 2L | 1289,394 | 1 | 1289,394 | 210,9158 | 0,004708 |
| Falta de Ajuste | 1548,056 | 1 | 1548,056 | 253,2271 | 0,003926 |
| Erro puro | 12,227 | 2 | 6,113 | | |
| SS total | 5536,356 | 8 | | | |

^a SS = soma dos quadrados, df = graus de liberdade e MS = quadrados médios.

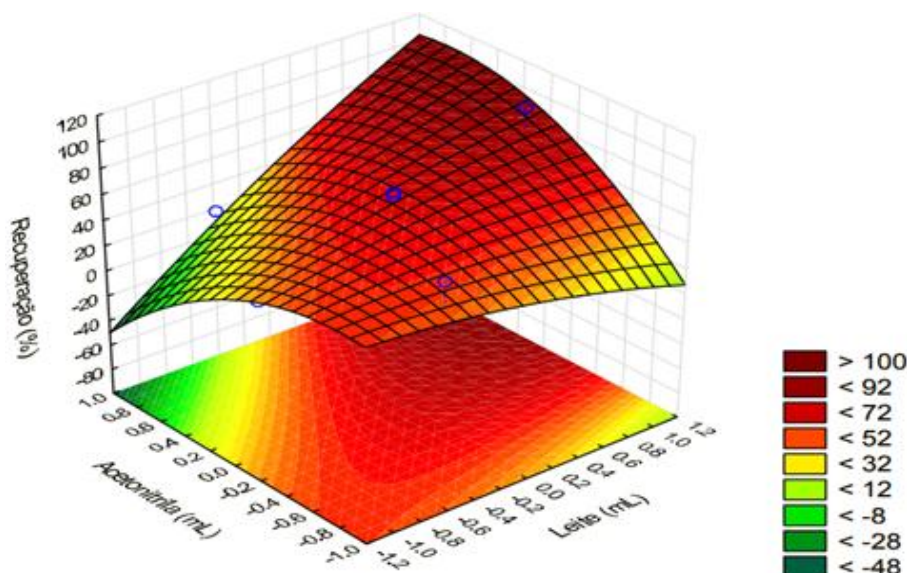
^b Os fatores significativos estão marcados em negrito (p<0,05).

Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado:

$$\text{Recuperação (\%)} = 67,503 - 11,302 (\text{Leite}) - 1,433 (\text{Leite})^2 - 1,193 (\text{Acetonitrila}) - 23,194 (\text{Acetonitrila})^2 + 17,954 (\text{Leite} * \text{acetonitrila}) + 0 \quad \text{Equação 6}$$

De acordo com a Figura 8, observa-se que o efeito das variáveis e suas interações apresentam ponto de sela. Para este experimento, encontram-se as melhores recuperações com maiores volumes de leite e acetonitrila.

Figura 8. Superfície de resposta obtida da matriz Doehlert para a otimização do volume de leite e volume de acetonitrila.



A partir da análise dos resultados da primeira matriz foi criada uma nova matriz, adotando pontos centrais diferentes (Tabela 14).

Tabela 14. Conjunto de experimentos e resultados da Matriz Doehlert para dois fatores na segunda matriz.

| Experimento | Variáveis independentes | | Recuperação (%) |
|-------------|-------------------------|-------------------|-----------------|
| | Leite (mL) | Acetonitrila (mL) | |
| 1.1 | 10 (0) | 10 (0) | 97,56 |
| 1.2 | 10 (0) | 10 (0) | 99,83 |
| 1.3 | 10 (0) | 10 (0) | 100,05 |
| 2 | 14 (1) | 10 (0) | 79,01 |
| 3 | 12 (0,5) | 14 (0,866) | 87,32 |
| 4 | 6 (-1) | 10 (0) | 85,73 |
| 5 | 8 (-0,5) | 6 (-0,866) | 96,55 |
| 6 | 12 (0,5) | 6 (-0,866) | 95,32 |
| 7 | 8 (-0,5) | 14 (0,866) | 88,72 |

Os valores encontrados para ANOVA estão apresentados na Tabela 15. Os resultados mostraram que as duas variáveis apresentaram efeito significativo linear (L) ou quadrático

(Q). A falta de ajuste não foi observada, indicando que o modelo descreve adequadamente a relação entre os fatores experimentais e as variáveis respostas.

Tabela 15. Resultados da ANOVA para a matriz Doehlert do segundo experimento.

| | SS ^a | df ^a | MS | F | p ^b |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| (1) Leite (mL) (L) | 21,5204 | 1 | 21,5204 | 11,3251 | 0,078096 |
| Leite (mL) (Q) | 337,7479 | 1 | 337,7479 | 177,7402 | 0,005579 |
| (2) Acetonitrila (mL) (L) | 62,6472 | 1 | 62,6472 | 32,9682 | 0,029018 |
| Acetonitrila (mL) (Q) | 18,8813 | 1 | 18,8813 | 9,9363 | 0,087616 |
| 1L por 2L | 0,0072 | 1 | 0,0072 | 0,0038 | 0,956440 |
| Falta de Ajuste | 2,7880 | 1 | 2,7880 | 1,4672 | 0,349489 |
| Erro puro | 3,8005 | 2 | 1,9002 | | |
| SS total | 428,9784 | 8 | | | |

^a SS = soma dos quadrados, df = graus de liberdade e MS = quadrados médios.

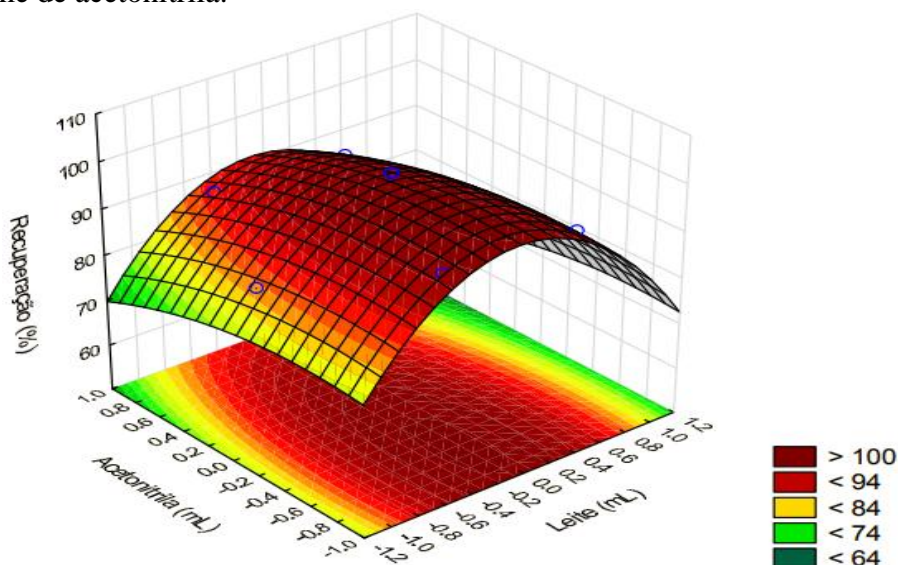
^b Os fatores significativos estão marcados em negrito ($p < 0,05$).

As respostas experimentais obtidas foram utilizadas no cálculo do modelo de regressão, que apresentou a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = 99,149 - 1,338 (\text{Leite}) - 4,194 (\text{Leite})^2 - 3,958 (\text{Acetonitrila}) - 2,975 (\text{Acetonitrila})^2 + 0,041 (\text{Leite} * \text{acetonitrila}) + 0 \quad \text{Equação 7}$$

A partir da Figura 9 percebe-se que para altas e baixas concentrações destas variáveis há uma baixa recuperação. Deste modo, o ideal é trabalhar em concentrações em torno do ponto central.

Figura 9. Superfície de resposta obtida da matriz Doehlert para a otimização do volume de leite e volume de acetonitrila.



A partir dos valores críticos obtidos por meio da equação do modelo (Tabela 16), foram calculados os valores reais das duas variáveis (Tabela 17).

Tabela 16. Valores críticos para as duas variáveis.

| Variáveis | Mínimo observado | Valores críticos | Máximo observado |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| Leite (mL) | -1,000 | -0,078 | 1,000 |
| Acetonitrila (mL) | -0,866 | -0,575 | 0,866 |

Tabela 17. Valores otimizados com o planejamento Matriz Doehlert para duas variáveis.

| Variáveis | Valor otimizado |
|-------------------|-----------------|
| Leite (mL) | 9,64 |
| Acetonitrila (mL) | 7,34 |

O modelo gerado foi validado comparando-se a resposta predita (100,5 %) com a resposta obtida experimentalmente (98,9%) na condição otimizada. Os resultados são considerados iguais estatisticamente pelo teste t para 95% de confiança.

5.3.4 Otimização por Matriz Doehlert para três variáveis independentes

Os resultados obtidos para recuperação a partir das condições da Matriz Doehlert para as três variáveis $MgSO_4$, $Na_3C_6H_5O_7$ e $NaCl$ podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 18. Matriz Doehlert para três variáveis independentes com os valores reais e suas respectivas coordenadas e respostas experimentais.

| Experimentos | Variáveis independentes | | | Recuperação (%) |
|--------------|-------------------------|---------------------|--------------|-----------------|
| | $MgSO_4$ (g) | $Na_3C_6H_5O_7$ (g) | $NaCl$ (g) | |
| 1.1 | 4 (0) | 1,5 (0) | 0,75 (0) | 93,34 |
| 1.2 | 4 (0) | 1,5 (0) | 0,75 (0) | 103,95 |
| 1.3 | 4 (0) | 1,5 (0) | 0,75 (0) | 97,11 |
| 2 | 5 (1) | 1,5 (0) | 0,75 (0) | 69,05 |
| 3 | 4,5 (0,5) | 2 (0,866) | 0,75 (0) | 79,95 |
| 4 | 4,5 (0,5) | 1,67 (0,289) | 1 (0,817) | 94,33 |
| 5 | 3 (-1) | 1,5 (0) | 0,75 (0) | 89,30 |
| 6 | 3,5 (-0,5) | 1 (-0,866) | 0,75 (0) | 77,51 |
| 7 | 3,5 (-0,5) | 1,33(-0,289) | 0,5 (-0,817) | 78,78 |
| 8 | 4,5 (0,5) | 1 (-0,866) | 0,75 (0) | 86,80 |
| 9 | 4,5 (0,5) | 1,33 (-0,289) | 0,5 (-0,817) | 89,42 |
| 10 | 3,5 (-0,5) | 2 (0,866) | 0,75 (0) | 86,42 |
| 11 | 4 (0) | 1,83 (0,577) | 0,5 (-0,817) | 79,02 |
| 12 | 3,5 (-0,5) | 1,67 (0,289) | 1 (0,817) | 80,54 |
| 13 | 4 (0) | 1,17 (-0,577) | 1 (0,817) | 82,06 |

Entre parênteses são os valores codificados e os demais são os valores reais.

Com base nos resultados observados na Tabela 19, foi possível observar que o modelo matemático não foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para as três variáveis estudadas. O valor para falta de ajuste foi não significativo, indicando que houve uma boa relação entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados.

Tabela 19. Resultados da ANOVA para a matriz Doehlert para três variáveis independentes.

| | SS ^a | df ^a | MS | F | p |
|--|-----------------|-----------------|---------|--------|-------|
| (1) MgSO ₄ (L) | 10,986 | 1 | 10,986 | 0,379 | 0,600 |
| MgSO ₄ (Q) | 432,300 | 1 | 432,300 | 14,903 | 0,061 |
| (2) Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (L) | 0,952 | 1 | 0,952 | 0,032 | 0,872 |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Q) | 245,351 | 1 | 245,351 | 8,478 | 0,100 |
| (3) NaCl (L) | 15,719 | | 15,719 | 0,543 | 0,537 |
| NaCl (Q) | 220,224 | | 220,224 | 7,609 | 0,110 |
| 1L por 2L | 62,010 | 1 | 62,010 | 0,0038 | 0,280 |
| 1L por 3L | 15,885 | | 15,885 | 2,142 | 0,535 |
| 2L por 3L | 49,113 | | 49,113 | 0,548 | 0,322 |
| Falta de Ajuste | 345,118 | 1 | 115,039 | 1,697 | 0,207 |
| Erro puro | 57,879 | 2 | 28,939 | 3,975 | |
| SS total | 1133,718 | 8 | | | |

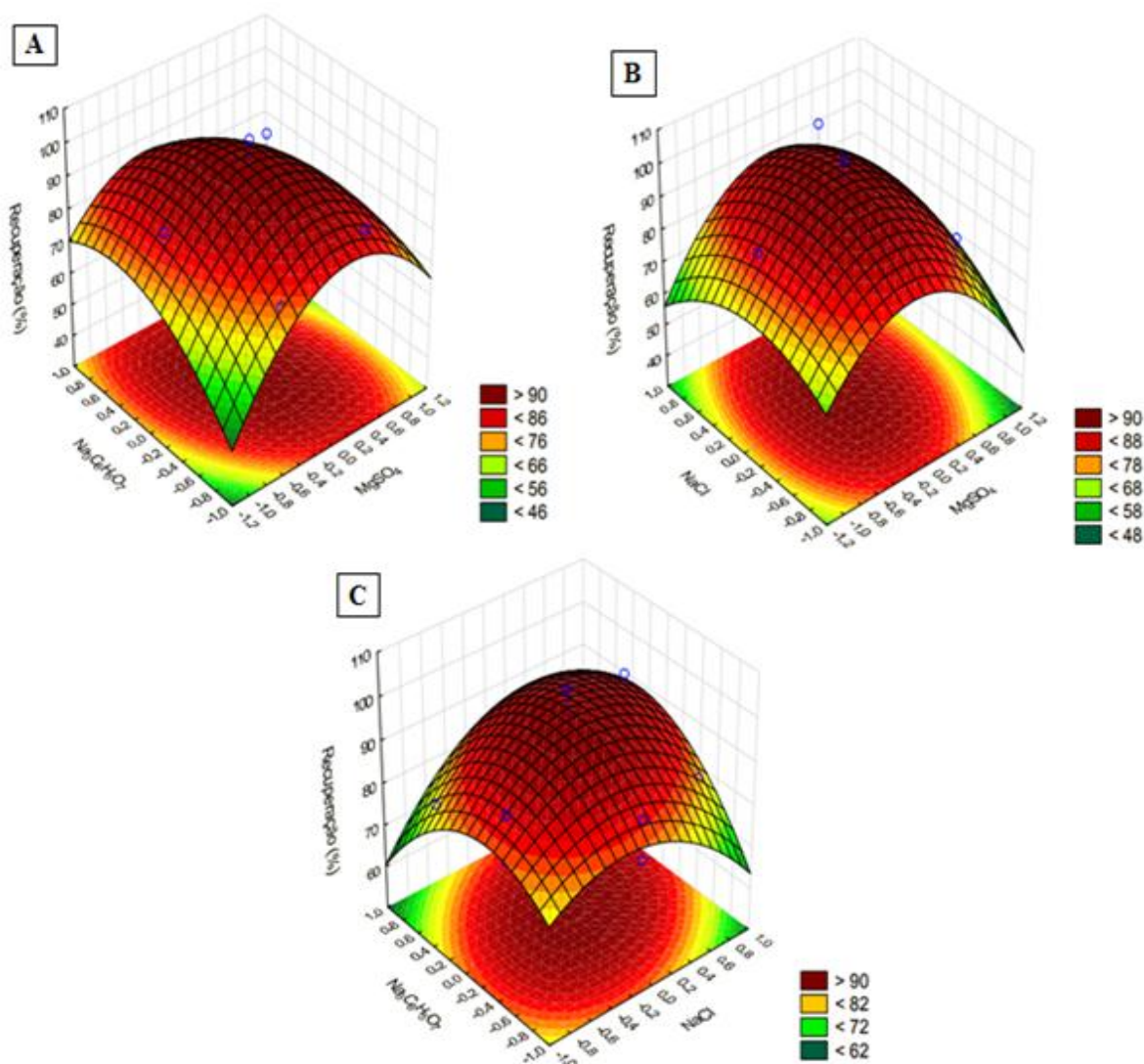
^a SS = soma dos quadrados, df = graus de liberdade e MS = quadrados médios.

Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado:

$$\begin{aligned} \text{Recuperação (\%)} = & 98,138 - 1,657 (\text{MgSO}_4) - 18,958 (\text{MgSO}_4)^2 + 0,422 (\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) - \\ & 10,724 (\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^2 + 1,618 (\text{NaCl}) - 8,567 (\text{NaCl})^2 - 7,874 (\text{MgSO}_4 * \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) + \\ & 4,201 (\text{MgSO}_4 * \text{NaCl}) + 6,396 (\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 * \text{NaCl}) \end{aligned} \quad \text{Equação 8}$$

Os gráficos de superfície de resposta estão apresentados na Figura 10, ilustrando o efeito das variáveis e suas interações.

Figura 10. Gráficos de superfície de resposta em relação às variáveis: A) MgSO_4 x $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ B) MgSO_4 x NaCl e C) $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ x NaCl .



A partir dos gráficos apresentados na Figura 10 foi possível confirmar que, dentro do domínio experimental investigado todas as variáveis (MgSO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e NaCl) exerceram influência na recuperação da sulfadoxina no leite, podendo-se verificar que em concentrações maiores, bem como em menores dos sais utilizados, tem-se uma diminuição na recuperação do analito. Isso pode ser explicado, uma vez que, em concentrações menores, pode prejudicar o efeito salting-out, ou seja, a separação das substâncias solúveis em água pela adição de sais. Porém, quando adicionados em excesso pode prejudicar o efeito de separação das fases líquido-líquido.

Os valores ideais de cada variável foram encontrados pelo ponto ótimo do modelo, uma vez que eles representam o ponto em que a média geométrica das recuperações da sulfadoxina é máxima. A partir dos valores preditos (Tabela 20) foram calculados os valores reais das três variáveis estudadas (Tabela 21).

Tabela 20. Valores preditos para as três variáveis.

| Variáveis | Mínimo observado | Valores críticos | Máximo observado |
|--|------------------|------------------|------------------|
| MgSO ₄ | -1,000 | -0,045 | 1,000 |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ | -0,866 | 0,059 | 0,866 |
| NaCl | -0.817 | 0,089 | 0.817 |

Tabela 21. Valores otimizados com o planejamento Matriz Doehlert para as três variáveis.

| Variáveis | Valor otimizado |
|--|-----------------|
| MgSO ₄ (g) | 3,954 |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (g) | 1,534 |
| NaCl (g) | 0,777 |

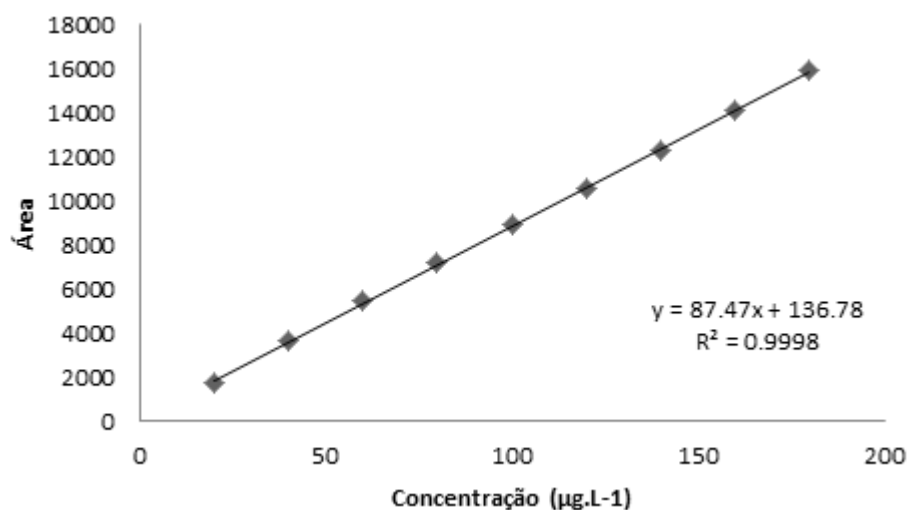
O modelo gerado foi validado comparando-se a resposta predita (98,2 %) com a resposta obtida experimentalmente (99,4 %) na condição otimizada. Os resultados são considerados iguais estatisticamente pelo teste t para 95% de confiança.

5.4 Validação do método QuEChERS

Após a otimização do método de extração QuEChERS para a determinação de sulfadoxina em leite, fez-se necessário realizar a validação da metodologia, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de díodos.

5.4.1 Linearidade

A curva analítica foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, levando em consideração a área do pico e a concentração de sulfadoxina (Figura 11).

Figura 11. Representação gráfica da curva analítica para a sulfadoxina.

A curva analítica para a sulfadoxina foi construída em oito níveis de concentração (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 $\mu\text{g.L}^{-1}$). A faixa de linearidade estudada inclui o valor de Limite Máximo de Resíduo (LMR) de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para sulfadoxina em leite, estabelecido pela ANVISA (2018).

O coeficiente de correlação linear (0.9998) encontrado para a curva da sulfadoxina está de acordo com o valor preconizado pela ANVISA (2017), que deve estar acima de 0.990, julgando-se, portanto, satisfatória a linearidade da equação da reta com o coeficiente de determinação próximo de 1, ou seja, a dispersão do conjunto de pontos experimentais é baixa.

A Tabela 22 mostra os resultados da análise estatística pelo teste ANOVA, em que se pode observar que a regressão foi significativa para o analito em estudo (F calculado $>$ F crítico), ou seja, a concentração da sulfadoxina tem correlação com o sinal do equipamento (área dos picos).

Tabela 22. Análise da Variância (ANOVA) da regressão linear da sulfadoxina.

| Fonte de Variação | GL | SQ | MQ | F calculado | F crítico |
|-------------------|----|-------------|-------------|-------------|-------------------------|
| Regressão | 1 | 183624017,1 | 183624017,1 | 34040,129 | 3,626E10 ⁻¹⁴ |
| Resíduo | 7 | 37760,37674 | 5394,339 | | |
| Total | 8 | 184,339 | | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados.

5.4.2 Precisão

Para a avaliação da precisão do método, foi calculado o Desvio Padrão Relativo (DPR) para o analito em três níveis de concentrações, sendo avaliada em termos de repetibilidade (intra-dia) e reprodutibilidade (inter-dias) (Tabela 23).

Tabela 23. Precisão do método analítico para determinação de sulfadoxina em leite, expressa pelo desvio padrão relativo.

| Concentração de antibiótico em leite ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Precisão intra-dia DPR (%) * | Precisão inter-dias DPR (%) * |
|---|---------------------------------|----------------------------------|
| 40 | 1,18 | 1,53 |
| 100 | 0,97 | 2,09 |
| 160 | 1,34 | 0,92 |

* Média dos valores em 6 replicatas

Os DPR obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para a sulfadoxina estão abaixo do limite máximo preconizado de 2,0% (GODSE et al., 2010), o que

confirma a precisão do método analítico desenvolvido. Zhang et al. (2015) encontraram valores de precisão intra-dia (2,18 – 5,97 % DPR) e inter-dias (7,16 – 9,41 % DPR) para sulfadoxina a partir do método QuEChERS com outras modificações analisado por CLAE, superiores aos resultados encontrados no presente trabalho, sendo menos preciso.

5.4.3 Exatidão

O método se mostrou adequado para os três níveis de fortificação, apresentando recuperações entre 99,42 e 108,77 % para a sulfadoxina, encontrando-se dentro da faixa aceitável para validação do método, que para análise de resíduos compreende entre 70 e 120 % segundo Lanças (2004) (Tabela 24).

Tabela 24. Exatidão do método analítico para determinação de sulfadoxina em leite, expressa pela recuperação do analito.

| Concentração de antibiótico em leite ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Recuperação intra-dia R (%) * | Recuperação inter-dias R (%) * |
|---|-------------------------------|--------------------------------|
| 40 | 108,77 | 108,34 |
| 100 | 99,42 | 100,67 |
| 160 | 100,54 | 100,93 |

* Média dos valores em seis replicatas

Armentano et al. (2018) realizaram o processo de validação por CLAE com um diferente método de extração para diferentes sulfonamidas em leite, incluindo a suldafoxina, encontrando valores de recuperação na faixa de 81 a 83 % para sulfadoxina, nas concentrações de 50, 100 e 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, abaixo dos resultados encontrados no presente trabalho.

5.4.4 Seletividade

A Figura 12 apresenta um cromatograma obtido com a análise de uma amostra de leite isenta de antibiótico (branco), podendo ser comparada com a Figura 12 do cromatograma obtido com a análise de uma amostra de leite fortificada com o antibiótico sulfadoxina na concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Figura 12. Banda cromatográfica da amostra de leite.

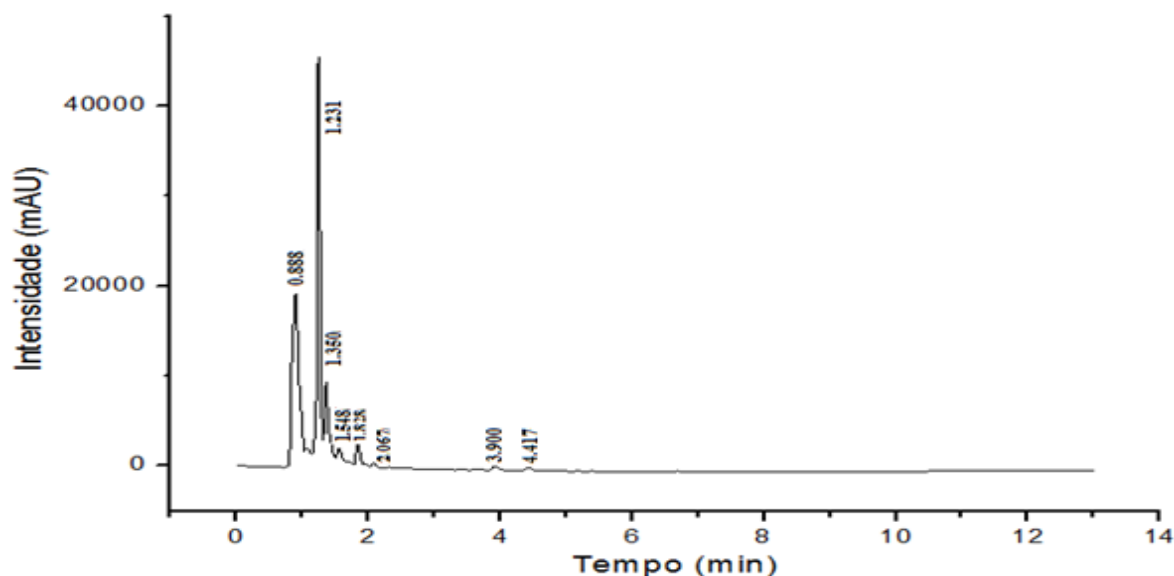
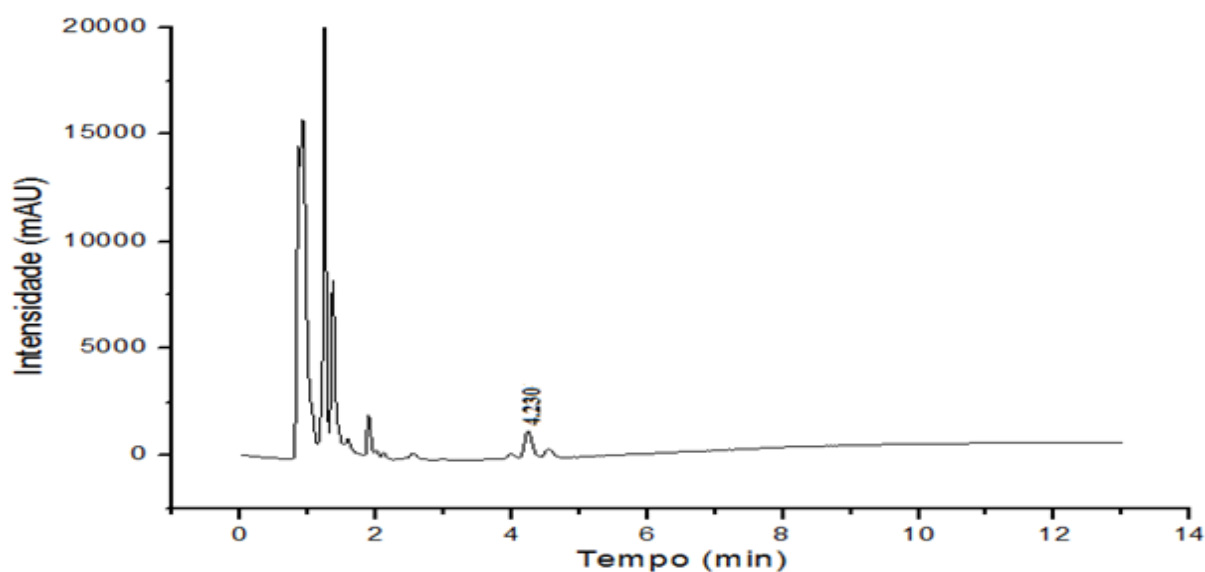


Figura 13. Banda cromatográfica da sulfadoxina na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ na amostra de leite ($T_R=4,23$ minutos).



O método foi considerado seletivo, uma vez que não foram detectadas bandas cromatográficas interferentes na faixa cromatográfica de interesse, ou seja, no mesmo tempo de retenção da sulfadoxina. Além disso, houve preocupações para garantir a resolução e pureza dos picos cromatográficos.

5.4.5 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ mostraram que o método pode ser aplicado para a detecção de resíduos de sulfadoxina, uma vez que, foi possível detectar e quantificar os mesmos em concentrações baixas, menores que o limite máximo de resíduo permitido pela legislação em leite, que é de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 25).

Tabela 25. Resultado do limite de detecção e do limite de quantificação para sulfadoxina em leite.

| Antimicrobiano | Limite de detecção ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Limite de quantificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$) |
|----------------|---|--|
| Sulfadoxina | 6,03 | 18,30 |

5.5 Aplicação do método em amostras reais

A mastite foi confirmada nas três vacas a partir do teste da caneca do fundo preto com a presença de grumos no leite e análise de contagem de células somáticas. Os valores encontrados para CCS estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Contagem de Células Somáticas (CCS) para confirmação da mastite.

| Animais | CCS no leite (x 1000/mL) |
|---------|--------------------------|
| 1 | 1843 |
| 2 | 3685 |
| 3 | 7160 |

O valor de CCS para distinguir entre vacas não infectadas e infectadas no nível individual de cada vaca foi estabelecido em 200.000 células/mL de leite (WALL et al., 2018; LIPKENS et al., 2019). Dessa forma, considerou-se que os valores encontrados para CCS para as três vacas estudadas (Tabela 26) estavam acima do recomendado para o leite de uma vaca com o úbere saudável, sendo aplicado o tratamento para a cura da mastite.

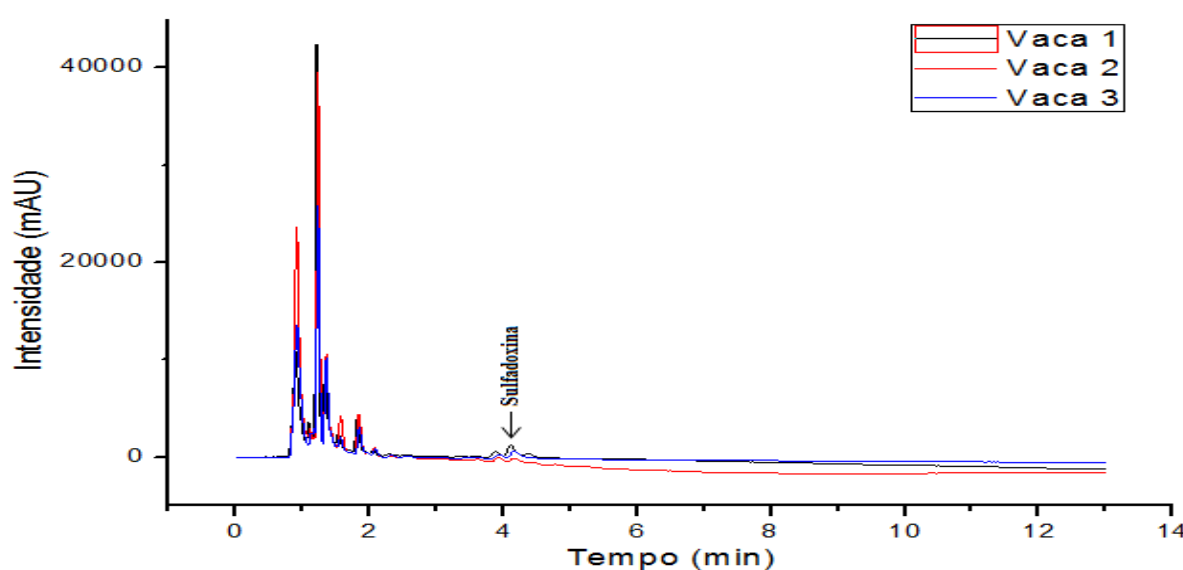
O método QuEChERS foi aplicado para determinação de sulfadoxina nas amostras de leite das três vacas que passaram por tratamento. A Tabela 27 apresenta os resultados das concentrações de sulfadoxina excretadas nas amostras de leite das três vacas em tempos diferentes de coleta.

Tabela 27. Concentrações de sulfadoxina em amostras de leite de três vacas submetidas a tratamento para cura da mastite.

| Tempo (horas) | Concentração de sulfadoxina $\mu\text{g.L}^{-1}$ | | |
|---------------|--|--------|---------|
| | Vaca 1 | Vaca 2 | Vaca 3 |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 1068,81 | 612,84 | 1061,16 |
| 8 | 1036,40 | 347,54 | 1018,92 |
| 12 | 613,40 | 220,92 | 560,48 |
| 24 | 130,48 | 35,54 | 94,85 |
| 48 | 27,50 | 19,35 | 20,34 |
| 72 | 0 | 0 | 0 |

Avaliando os resultados obtidos na Tabela 27 conclui-se que a vaca 1 no término do tempo de carência (24 horas) excretou sulfadoxina no valor de $130,48 \mu\text{g.L}^{-1}$, ou seja, valor acima do limite máximo de resíduos de sulfadoxina permitido pela ANVISA (2018), $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Spinosa et al (2011) afirma que a concentração de resíduos de antimicrobianos no leite após o tratamento pode-se apresentar muitas vezes além do período de carência preconizado, por diversos fatores internos (fisiológicos e patológicos) e externos que podem alterar a biotransformação do medicamento. As três vacas apresentaram diferentes concentrações de sulfadoxina no período de 24 horas após o tratamento (Figura 14).

Figura 14. Cromatograma do leite com sulfadoxina excretado das três vacas no tempo de 24 horas.



O teste de triagem empregado na detecção dos resíduos de antimicrobianos (kit Delvotest® SP-NT) mostrou-se eficiente na detecção de resíduos de sulfadoxina nas amostras reais analisadas (Tabela 28). Nas concentrações em torno de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ como nas amostras no tempo de 48 horas, o teste não detectou a presença da sulfadoxina no leite.

Tabela 28. Resultado das análises de sensibilidade do Kit Delvotest® SP-NT para as amostras de leite das três vacas no intervalo de tempo (horas) estudado.

| Animais | Resultado | | | | | | |
|---------|----------------|---|---|----|----|----|----|
| | Tempo (horas) | | | | | | |
| | 0 ¹ | 4 | 8 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| 1 | - | + | + | + | + | - | - |
| 2 | - | + | + | + | + | - | - |
| 3 | - | + | + | + | + | - | - |

¹ Antes da aplicação do medicamento

6 CONCLUSÃO

Em razão da importância do desenvolvimento de metodologias analíticas mais limpas, seguindo o princípio da química verde, foram obtidos bons resultados, utilizando menor quantidade do solvente acetonitrila (22%) com vazão relativamente baixa na fase móvel ($1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), descarte da etapa de *clean up* para purificação dos extratos, substituição do gás nitrogênio pela secagem das amostras no rotaevaporador, além de ocorrer a redução dos reagentes utilizados no processo extração após a realização do planejamento Doehlert, representando menor consumo de reagentes e menor geração de resíduos.

O método QuEChERS desenvolvido e validado neste trabalho, apresenta como vantagens sua simplicidade de operação, rapidez, baixo custo e ambientalmente mais eficiente. Portanto, conclui-se que houve contribuições de forma expressiva com o desenvolvimento do método para extração de sulfadoxina em amostras de leite.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R. Methods for Diagnosing Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, p. 479-491, 2018.

AHMED, S.; NING, J.; CHENG, G.; AHMAD, I.; LI, J.; MINGYUE, L.; QU, W.; IQBAL, M.; SHABBIR, M. A. B.; YUAN, Z. Receptor-based screening assays for the detection of antibiotics residues – A review. **Talanta**, v. 166, p. 176-186, 2017.

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

ALBENZIO, M.; FIGLIOLA, L.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; SEVI, A.; SANTILLO, A. Somatic cell count in sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 176, p. 24-30, 2019.

ALBERO, B.; TADEO, J. L.; ESCARIO, M.; MIGUEL, E.; PEREZ, R. A. Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. **Science of the Total Environment**, v. 643, p. 1562-1570, 2018.

ALCÂNTARA, D. B.; FERNANDES, T. S. M.; NASCIMENTO, H. O.; LOPES, A. F.; MENEZES, M. G. G.; LIMA, A. C. A.; CARVALHO, T. V.; GRINBERG, P.; MILHOME, M. A.; OLIVEIRA, A. H. B.; BECKER, H.; ZOCCOLO, G. J.; NASCIMENTO, R. F. Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. **Food Chemistry**, v. 298, p. 124-958, 2019.

ALLADIO, E.; PIRRO, V.; SALOMONE, A.; VINCENTI, M.; LEARDI, R. Chemometric approach to open validation protocols Prediction of validation parameters in multi-residue ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 878, p. 78-86, 2015.

ALTHAUS, R. L.; TORRES, A.; MONTERO, A.; BALASCH, S.; MOLINA, M. P. Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest photometric measurements. **Journal of dairy science**, v. 86, p. 457-463, 2003.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive

solid-phase extraction” for the determination of pesticide residue in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANGEL, M. J. R.; COQUE, M. C. G. A.; BERTHOD, A.; BROCH, S. C. Are analysts doing method validation in liquid chromatography?. **Journal of chromatography A**, v.1353, p. 2-9, 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. Brasília, 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos**. Brasília, 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVET**. Brasília, 2009.

ARIAS, J. L. O.; ROCHA, C. B.; SANTOS, A. L. Q. S.; MARUBE, L. C.; KUPSKI, L.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Fast and simple method of simultaneous preservative determination in diferente processed foods by QuEChERS and HPLC-UV: Method development, survey and estimate of daily intake. **Food Chemistry**, v. 293, p. 112–119, 2019.

ARMENTANO, A.; SUMMA, S.; MAGRO, S.; PALERMO, C.; NARDIELLO, D.; CENTONZE, D.; MUSCARELLA, M. Rapid method for the quantification of 13 sulphonamides in milk by conventional high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection using a column packed with core-shell particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1531, p. 46-52, 2018.

BACANLI, M.; BASARAM. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 462-466, 2019.

BACH, K. D.; SIPKA, A.; MCART, J. A. A. Case study: Evaluating quarter and composite milk sampling for detection of subclinical intramammary infections in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 163, p. 51-57, 2019.

BARENG, A. P.; ESPINO, F. E.; CHAIJAROENKUL, W.; NA-BANGCHANG, K. Molecular monitoring of dihydrofolatereductase (dhfr) and dihydropteroatesynthetase (dhps)

associated with sulfadoxinepyrimethamine resistance in *Plasmodium vivax* isolates of Palawan, Philippines. **Acta Tropica**, v. 180, p. 81-87, 2018.

BARRETO, F.; JANK, L.; CASTILHOS, T.; RAU, R. B.; TOMASZEWSKI, C. A.; RIBEIRO, C.; HILLESHEIM, D. R. Chemical Residues and mycotoxins in raw milk. **Raw Milk**, p. 273-293, 2019.

BARTIKOVA, H.; PODLIPNA, R.; SKALOVA, L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. **Chemosphere**, v. 144, p. 2290-2301, 2016.

BERRUGA, M. I.; MOLINA, A.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M P. Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goat's milk. **Small Ruminant Research**, v. 142, p. 38-43, 2016.

BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P.; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; ALVES, J. P. S. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941-959, 2019.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BIELINKA, A. B.; STOLTE, S.; ARNING, J.; UEBERS, U.; BOSCHEN, A.; STEPNOWSKI, P.; MATZKE, M. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. **Chemosphere**, v. 85, p. 928-933, 2011.

BILANDZIC, N.; KOLANOVIC, B. S.; VARENINA, I.; SCORTICHINI, G.; ANNUNZIATA, L.; BRSTILO, M.; RUDAN, N. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. **Food Control**, v. 22, p. 1941-1948, 2011.

BRAGANÇA, I.; PLACIDO, A.; PAÍGA, P.; DOMINGUES, V. F.; MATOS, C. D. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. **Science of the Total Environment**, v. 433, p. 281-289, 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 5, de 23 de abril de 2019. Aprova o plano de amostragem e os limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC

de 2019 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de coelho, de aves e de avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2019. Seção 1, 4 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018b. Seção 1, 10 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018a. Seção 1, 9 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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**, Brasília, 1999. 51 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017. 108 p.

CALDAS, L. F. S.; PAULA, C. E. R.; BRUM, D. M.; CASELLA, R. J. Application of a four-variables Doehlert design for the multivariate optimization of copper determination in petroleum-derived insulating oils by GFAAS employing the dilute-and-shot approach. **Fuel**, v. 105, p. 503-511, 2013.

CERVA, C. Milking and Handling of Raw Milk: Effect of Storage and Transport on Milk Quality. **Reference Module in Food Science**, p. 642-648, 2016.

CHATZIMITAKOS, T.; SAMANIDOU, V.; STALIKAS, C. D. Graphene-functionalized melamine sponges for microextraction of sulfonamides from food and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1522, p. 1-8, 2017.

CHEN, J.; XIE, S. Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms. **Science of the total environment**, v. 640, p. 1465-1477, 2018.

COMUNIAN, R.; PABA, A.; DUPRÉ, I.; DAGA, E. S.; SCINTU, M. F. Evaluation of a microbiological indicator test for antibiotic detection in eww and goat milk. **Journal of dairy science**, v. 93, p. 5644-5650, 2010.

CONZUELO, F.; GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; PINACHO, D. G.; REVIEJO, A. J.; MARCO, M. P.; PINGARRON, J. M. Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 36, p. 81-88, 2012.

CRUZ, M. S. D.; BARCELO, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, 2007.

CURBELO, M. A. G.; RODRIGUEZ, B. S.; HERRERA, A. V. H.; SALAMO, J. G.; BORGES, J. H.; DELGADO, M. A. R. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169-185, 2015.

DIVYA, K.; NARAYANA, B.; SAMSHUDDIN, S. New spectrophotometric methods for the determination of sulfadoxine by the formation of Co(II) complexes. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p. 536-540, 2016.

DMITRIENKO, S. G.; KOCHUK, E. V.; APYARI, V. V., TOLMACHEVA, V. V.; ZOLOTOV, Y. A. Determination of the total content of some sulfonamides in milk using solid-phase extraction coupled with off-line derivatization and spectrophotometric detection. **Food Chemistry**, v. 188, p. 51-56, 2015.

DMITRIENKO, S. G.; KOCHUK, E. V.; APYARI, V. V.; TOLMACHEVA, V. V.; ZOLOTOV, Y. A. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 6-25, 2014.

DOEHRING, C.; SUNDRUM, A. The informative value of an overview on antibiotic consumption, treatment efficacy and cost of clinical mastitis at farm level. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 165, p. 63-70, 2019.

ECONOMOU, A.; PETRAKI, O.; TSIPI, D.; BOTITSI, E. Determination of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in honey and validation according to Commission Decision 2002/657/EC for banned compounds. **Talanta**, v. 97, p. 32-41, 2012.

ESTEKI, M.; SHAHSAVARI, Z.; GANDARA, J. S. Food identification by high performance liquid chromatography fingerprinting and mathematical processing. **Food Research International**, v. 122, p. 303-317, 2019.

FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Sulfadimethoxyne quantification in milk by high performance liquid chromatography. **Quím. nova**, v. 30, p. 80-82, 2007.

FERREIRA, S. L. C.; LEMOS, V. A.; CARVALHO, V. S.; SILVA, E. G. P.; QUEIROZ, A. F. S.; FELIX, C. S. A.; SILVA, D. L. F.; DOURADO, G. B.; OLIVEIRA, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176-182, 2018.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; SENDRA, J. M. B. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C.; SILVA JUNIOR, M. M.; FELIX, C. S. A.; SILVA, D. L. F.; SANTOS, A. S.; NETO, J. H. S.; SOUZA, C. T.; CRUZ JUNIOR, R. A.; SOUZA, A. S. Multivariate optimization techniques in food analysis – A review. **Food Chemistry**, v. 273, p. 3-8, 2019.

FORNSTEDT, T.; FORSSEN, P.; WESTERLUND, D. System peaks and their impact in liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 81, p. 42-50, 2016.

FREITAS, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Development and validation of a multi-residue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 38-43, 2013.

FU, L.; ZHOU, H.; MIAO, E.; LU, S.; JING, S.; HU, Y.; WEI, L.; ZHAN, J.; WU, M. Functionalization of amino terminated carbon nanotubes with isocyanates for magnetic solid phase extraction of sulfonamides from milk and their subsequent determination by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 289, p. 701-707, 2019.

GALAN, M. J. G.; CRUZ, M. S. D.; BARCELO, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 1008-1022, 2008.

GAO, S.; YANG, X.; YU, W.; LIU, Z.; ZHANG, H. Ultrasound-assisted ionic liquid/ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of sulfonamides in infant formula milk powder using high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 99, p. 875-882, 2012.

GAUDIN, V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 363-377, 2017.

GENTILI, A.; ROCCA, L. M.; CARETTI, F.; BELLANTE, S. Antibiotics and Drugs: Residue Determination. **Encyclopedia of food and Health**, p. 192-210, 2016.

GIKA, H.; KAKLAMANOS, G.; MANESIOTIS, P.; THEODORIDIS, G. Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 93-99, 2016.

GODSE, V.P.; BHOSALE, A.V.; BAFANA, Y.S.; BORKAR, D.D. ICH guidance in practice: Validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of Olmesartan medoximil and Hydrochlorothiazide in combination drug products. **Eurasian J. Anal. Chem.**, v. 5, n. 2, p. 137-144, 2010.

GOLUBOVIC, J.; HEATH, E.; HEATH, D. Validation challenges in liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for the analysis of naturally occurring compounds in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 294, p. 46-55, 2019.

GONÇALVES, J. L.; KAMPHUIS, C.; MARTINS, C. M. M. R.; BARREIRO, J. R.; TOMAZI, T.; GAMEIRO, A. H.; HOGEVEEN, H.; SANTOS, M. V. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, p. 25-32, 2018.

GUERREIRO, T. M.; OLIVEIRA, D. N.; MELO, C. F. O. R.; LIMA, E. O.; RIBEIRO, M. S.; CATHARINO, R. R. Evaluating the effects of the adulterants in milk using direct-infusion high-resolution mass spectrometry. **Food Research International**, v.108, p.498-504, 2018.

GUETOUACHE, M.; GUESSAS, B.; MEDJEKAL, S. Composition and nutritional value of raw milk. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 115-122, 2014.

HAGHIGHI, F.; TELEBPOUR, Z.; NEZHAD, A. S. Towards fully integrated liquid chromatography on a chip: Evolution and evaluation. **Trends in Analytical Chemistry**, v.105, p. 302-337, 2018.

HIBA, A.; CARINE, A.; HAIFA, A. R.; RYSZARD, L.; FAROUK, J. Monitoring of twenty-two sulfonamides in edible tissues: Investigation of new metabolites and their potential toxicity. **Food Chemistry**, v. 192, p. 212-227, 2016.

HOFF, R.; PIZZOLATO, T. M.; CRUZ, M. S. D. Trends in sulfonamides and their by-products analysis in environmental samples using mass spectrometry techniques. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 9, p. 24-36, 2016.

HOU, X.; CHEN, G.; ZHU, L.; YANG, T.; ZHAO, J.; WANG, L.; WU, Y. Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk. **Journal of Chromatography B**, v. 962, p. 20-29, 2014.

HUANG, J.; LIU, J.; ZHANG, C.; WEI, J.; MEI, L.; YU, S.; LI, G.; XU, L. Determination of sulfonamides in food samples by membrane-protected micro-solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 66-74, 2012.

HUANG, X.; QIU, N.; YUAN, D. Simple and sensitive monitoring of sulfonamide veterinary residues in milk by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and high performance liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8240-8245, 2009.

ISLAM, M. A.; ROY, S.; NABI, A.; SOLAIMAN, S.; RAHMAN, M.; HUG, M.; SIDDIQUEE, N. A.; AHMED, N. Microbiological quality assessment of milk at different stages of the dairy value chain in a developing country setting. **International Journal of Food Microbiology**, v. 278, p. 11-19, 2018.

JAISWAL, P.; JHA, S. N.; BORAH, A.; GAUTAM, A.; GREWAL, M. K.; JINDAL, G. Detection and quantification of soy milk in cow-buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). **Food Chemistry**, v. 168, p. 41-47, 2015.

JIA, X.; ZHAO, P.; YE, X.; ZHANG, L.; WANG, T.; CHEN, Q.; HOU, X. A novel metal-organic framework composite MIL-101(Cr)@GO as an efficient sorbent in dispersive micro-solid phase extraction coupling with UHPLC-MS/MS for the determination of sulfonamides in milk samples. **Talanta**, v. 169, p. 227-238, 2017.

JIANG, W.; BELOGLAZOKA, N. V.; WANG, Z.; JIANG, H.; WEN, K.; SAEGER, S.; LUO, P.; WU, Y.; SHEN, J. Development of a multiplex flow-through immunoaffinity chromatography test for the on-site screening of 14 sulfonamide and 13 quinolone residues in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 66, p. 124-128, 2015.

KARAGEORGOU, E.; MANOUSI, N.; SAMANIDOU, V.; KABIR, A.; FURTON, K. G. Fabric phase sorptive extraction for the fast isolation of sulfonamides residues from raw milk followed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Food Chemistry**, v. 196, p. 428-436, 2016.

KIM, D. W. et al. A novel sulfonamide resistance mechanism by two-component flavin-dependent monooxygenase system in sulfonamide-degrading actinobacteria. **Environment International**, v. 127, p. 206-215, 2019b.

KIM, H.; MIN, Y.; CHOI, B. Real-time temperature monitoring for the early detection of mastitis in dairy cattle: Methods and case researches. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 162, p. 119-125, 2019a.

KIM, L.; LEE, D.; CHO, H. K.; CHOI, S. D. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, p. 63, 2019c.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, PEKKA, LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8-28, 2015.

KUNG, T.; TSAI, C.; KU, B. C.; WANG, W. A generic and rapid strategy for determining trace multiresidues of sulfonamides in aquatic products by using an improved QuEChERS method and liquid chromatography–electrospray quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 175, p. 189-196, 2015.

LAGO, A.; GODDEN, S. M. Use of rapid culture systems to guide clinical mastitis treatment decisions. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, p. 389-412, 2018.

LANCAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 6.ed. São Carlos: RiMA, 2004.

LEE, H.; CHEN, C.; WEI, J.; CHIU, H. Analysis of veterinary drug residue monitoring results for commercial livestock products in Taiwan between 2011 and 2015. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, p. 565-571, 2018.

LEHOTAY, S. J.; KOK, A. de; MAURICE, H.; BODEGRAVEN, P. V. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC Internation**, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.

LIPKENS, Z.; PIEPERS, S.; VERBEKE, J.; VliegHER, S. Infection dynamics across the dry period using Dairy Herd Improvement somatic cell count data and its effect on cow performance in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 640-651, 2019.

LIU, N.; HUANG, W.; LI, Z.; SHAO, H.; WU, M.; LEI, J.; TANG, L. Radiolytic decomposition of sulfonamide antibiotics: Implications to the kinetics, mechanisms and toxicity. **Separation and Purification Technology**, v. 202, p. 259-265, 2018.

LIU, R.; HE, P.; LI, Z.; LI, R. Simultaneous Determination of 16 sulfonamides in animal feeds by UHPLC-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 1-7, 2011.

LOPES, R. P.; PASSOS, E. E. F.; FILHO, J. F. A.; VARGAS, E. A.; AUGUSTI, D. V.; AUGUSTI, R. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LCeMS/MS analysis. **Food Control**, v. 28, p. 192-198, 2012.

MANNING, L.; SOON, J. M. Developing systems to control food adulteration. **Food Policy**, v. 49, p. 23-32, 2014.

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

MARCHIS, D.; FERRO, G. L.; BRIZIO, B.; SQUADRONE, S.; ABETE, M. C. Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. **Food Control**, v. 25, p. 270-273, 2012.

MASZKOWSKA, J.; KOŁODZIEJSKA, M.; BIELINSKA, A. B.; MROZIK, W.; KUMIRSKA, J.; STEPNOWSKIM, P.; PALAVINSKAS, R.; KRUGER, O.; KALBE, U. Column and batch tests of sulfonamide leaching from different types of soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 468-474, 2013.

MAYOR, A. S.; RODRIGUEZ, B. S.; HERRERA, A. V. H.; DELGADO, M. A. R. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 214-235, 2019.

MEHDID, A.; OLIVES, A. M. D.; FERNANDEZ, N.; RODRIGUEZ, M.; PERIS, C. Effect of stress on somatic cell count and milk yield and composition in goats. **Research in Veterinary Science**, v. 125, p. 61-70, 2019.

MENKEM, Z. E.; NGANGOM, B. L.; TAMUNJOH, S. S. A.; BAYOM, F. F. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. **Acta Ecologica Sinica**, p. 5, 2018.

MOREIRA, L. H.; SOUZA, J. C. P.; LIMA, C. J.; SALGADO, M. A. C.; FERNANDES, A. B.; ANDREANE, D. I. K.; VILLAVERDE, A. B.; ZANGARO, R. A. Use of photodynamic therapy in the treatment of bovine subclinical mastitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 246-251, 2018.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p.10128-10149, 2016.

MWALWISI, Y. H.; HOELLEIN, L.; KAALE, E.; HOLZGRABE, U. Development of a simple, rapid, and robust liquid chromatographic method for the simultaneous determination of sulfalene, sulfadoxine, and pyrimethamine in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 558-570, 2016.

NAIK, L.; SHARMA, R.; MANN, B.; LATA, K.; RAJPUT, Y. S.; NATH, B. S. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. **Food Chemistry**, v. 219, p. 85-92, 2017.

NEBOT, C.; REGAL, P.; MIRANDA, J. M.; GENTE, C.; CEPEDA, A. Rapid method for quantification of nine sulfonamides in bovine milk using HPLC/MS/MS and without using SPE. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2294-2299, 2013.

NOVAES, C. G.; BEZERRA, M. A.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, A. M. P.; ROMAO, I. L. S.; NETO, J. H. S. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331-346, 2016.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfície de resposta – Parte I: Variáveis de processo. **Virtual química**, v. 9, n. 3, p. 1-32, 2017.

PEREYRA, V. G.; POL, M.; PASTORINO, F.; HERRERO, A. Quantification of antimicrobial usage in dairy cows and preweaned calves in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 122, p. 273-279, 2015.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**. v.165, p. 216-224, 2007.

POGHOSSIAN, A.; GEISLER, H.; SCHONING, M. J. Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 140, p. 111-272, 2019.

PONTE, H.; IVO, R. S.; LIMA, B. S.; RAMOS, F. Quality control programmes for veterinary antimicrobial medicines. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 99, p. 1-4, 2018.

RAIKOS, V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 259-265, 2010.

RAMA, A.; LUCATELLO, L.; BENETTI, C.; GALINA, G.; BAJRAKTARI, D. Assessment of antibacterial drug residues in milk for consumption in Kosovo. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 525-532, 2017.

RAVIOLO, M. A.; ALEGRE, M. R.; TORMOS, J. C.; PEIRO, M. E. C.; BROCH, S. C.; ROMERO, J. E. Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 152-156, 2007.

RAZA, N.; KIM, K. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 79-94, 2018.

REFAT, M. S. Spectroscopic and thermal investigations of charge-transfer complexes formed between sulfadoxine drug and different types of acceptors. **Journal of molecular structure**, v. 985, p. 380-390, 2011.

RIGGIO, V.; PORTOLANO, B. Genetic selection for reduced somatic cell counts in sheep milk: A review. **Small Ruminant Research**, v. 126, p. 33-42, 2015.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. Treatment of Mastitis in Cattle. Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**, v. 31, p. 17-46, 2015.

SANCHEZ, J. L.; LINARES, I. B.; KISS, A. S.; CARRETERO, A. S. Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Modern Techniques for food Authentication**, p. 459-526, 2018.

SANDHIYA, L.; SENTHILKUMAR, K. A theoretical probe on the non-covalent interactions of sulfadoxine drug with pi-acceptors. **Journal of Molecular Structure**, v. 1074, p.157-167, 2014.

SCHIANO, A. N.; HARWOOD, W. S.; DRAKE, M.A. A 100-Year Review: Sensory analysis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 9966-9986, 2017.

SHAH, V. P. et al. Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, 2000.

SONG, E.; YU, M.; WANG, Y.; HU, W. CHENG, D.; SWIHART, M. T.; SONG, Y. Multi-color quantum dot-based fluorescence immunoassay array for simultaneous visual detection of multiple antibiotic residues in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 72, p. 320-325, 2015.

SONG, Y.; JIANG, J.; MA, J.; ZHOU, Y.; GUNTEN, U. V. Enhanced transformation of sulfonamide antibiotics by manganese (IV) oxide in the presence of model humic constituents. **Water Research**, v. 153, p. 200-207, 2019.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011.

TASHO, R. P.; CHO, J. Y. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 563-564, p. 366-376, 2016.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TESTA, F.; MARANO, G.; AMBROGI, F.; BORACCHI, P.; CASULA, A.; BIGANZOLI, E.; MORONI, P. Study of the association of atmospheric temperature and relative humidity with bulk tank milk somatic cell count in dairy herds using Generalized additive mixed models. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 511-517, 2017.

TIAN, D.; LI, C. Risk assessment of raw milk quality and safety index system based on primary component analysis. **Sustainable computing: Informatics and Systems**, v. 21, p. 47-55, 2019.

TOLOSA, T.; VERBEKE, J.; PIEPERS, S.; TEFERA, M.; GETACHEW, Y.; SUPRE, K.; DEVLIEGHER, S. Milk production, quality, and consumption in Jimma (Ethiopia): Facts and producers', retailers', and consumers' perspectives. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 124, p. 9-14, 2016.

WAHAJUDDIN.; RAJU, K. S. R.; TANEJA, I. Bioanalysis of antimalarials using liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, 2013.

WALL, S. K.; WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R. M.; SCHWARZ, D. Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 5362-5373, 2018.

WANG, L.; WEI, W.; XIA, Z.; JIE, X.; XIA, Z. Z. Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 495-506, 2016.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, 2011.

WOLFE, C. S. P.; LESLIE, K. E.; SWARTZ, T. .; An Update on the Effect of Clinical Mastitis on the Welfare of Dairy Cows and Potential Therapies. Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**, v. 34, p. 525-535, 2018.

YANG, W.; ZHENG, F.; XUE, X.; LU, Y. Investigation into adsorption mechanisms of sulfonamides onto porous adsorbents. **Journal of colloid and Interface Science**, v. 362, p. 503-509, 2011.

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

YUAN, S.; LIU, Z.; YIN, H.; DANG, Z.; WU, P.; ZHU, N.; LIN, Z. Trace determination of sulfonamide antibiotics and their acetylated metabolites via SPE-LC-MS/MS in wastewater and insights from their occurrence in a municipal wastewater treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 815-821, 2019.

YUAN, Z. et al. A simple, accurate, time-saving and green method for the determination of 15 sulfonamides and metabolites in serum samples by ultra-high performance supercritical fluid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 1432, p. 132-139, 2016.

ZHAN, J.; YU, X. J.; ZHONG, Y. Y.; ZHANG, Z. T.; CUI, X. M.; PENG, J. F.; FENG, R. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 906, p. 48-57, 2012.

ZHANG, C.; DENG, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, Y.; YANG, L.; LIAO, C.; SU, L.; ZHOU, Y.; GONG, D.; CHEN, L.; LUO, A. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 517-537, 2019.

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

ZHANG, Y.; LI, X.; LIU, X.; ZHANG, J.; CAO, Y.; SHI, Z.; SUN, H. Multi-class, multi-residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, 2015.

ZHAO, X.; WANG, J.; WANG, J.; WHANG, S. Development of water-compatible molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high performance liquid

chromatography–tandem mass spectrometry for the detection of six sulfonamides in animal-derived foods. **Journal of chromatography A**, v. 1574, p. 9-17, 2018.

ZHENG, M-M.; ZHANG, M-Y.; PENG, G-Y.; FENG, Y-Q. Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, p. 160-172, 2008.