



KEITY MARGARETH DORETTO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VISANDO A QUANTIFICAÇÃO
DE SULFONAMIDAS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO E
ESTUDOS DE SORÇÃO/DESORÇÃO EM SOLOS**

CAMPINAS, 2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

KEITY MARGARETH DORETTO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VISANDO A QUANTIFICAÇÃO
DE SULFONAMIDAS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO E
ESTUDOS DE SORÇÃO/DESSORÇÃO EM SOLOS**

Orientadora: Profa. Dra. SUSANNE RATH

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR KEITY MARGARETH DORETTO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SUSANNE RATH.**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

D731d Doretto, Keity Margareth (1981-).
Desenvolvimento de métodos visando a
quantificação de sulfonamidas em medicamentos de uso
veterinário e estudos de sorção/dessorção em solos /
Keity Margareth Doretto. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadora: Susanne Rath.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Antimicrobianos. 2. Sulfonamidas. 3. *Freundlich*,
isotermas de. 4. Medicamentos veterinários. 5. Solos
tropicais. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development of methods aiming the quantification of sulfonamides in
veterinary drugs and studies of adsorption/desorption in soils

Palavras-chave em inglês:

Antimicrobials
Sulfonamides
Freundlich isotherms
Veterinary medicines
Tropical soils

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Susanne Rath [Orientadora]
Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz
Valdemar Luiz Tornisielo
José Roberto Guimarães
Carol Hollingworth Collins

Data de defesa: 08/08/2012

Programa de pós-graduação: Química

*“Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.
Não viva de fotografias amareladas...
Continue, quando todos esperam que desistas.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.
Quando não conseguires trotar, camínhe.
Quando não conseguires caminhar, use uma bengala.
Mas nunca se detenha”.*

Madre Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho,

A minha mãe Aparecida pelo amor incondicional.

*As minhas irmãs Sheila e Lucilaine e ao meu cunhado Alexandre pelo
incentivo, presença e amor.*

*Aos meus sobrinhos Giovani e Stephanie por serem tão queridos e por
enriquecerem minha vida.*

Ao Edson por todo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos fortalece nos momentos mais difíceis e por colocar a minha volta pessoas maravilhosas para que eu pudesse crescer como pessoa e como profissional.

À minha orientadora Profa. Dra. Susanne Rath, pela orientação, ensinamentos, apoio, confiança e amizade. Posso dizer que foi um privilégio ser sua aluna, meu profundo agradecimento e admiração.

À minha família por todo apoio, paciência e amor.

Ao Edson por seu amor, paciência e compreensão nesta etapa da minha da minha vida e por ser único.

Ao casal 21, Cyntia e Ricardo pelo apoio, otimismo, conversas e ajudas prestadas no decorrer deste trabalho. E em especial à Cyntia que me ajudou e incentivou em todos os momentos, sejam felizes ou tristes sempre ali, pronta para escutar ou dizer alguma palavra.

Aos colegas, companheiros e amigos do grupo Paracelsus: Cyntia, Ricardo, Andreza, Mónica (Monikita), Livia, Leonardo, Laís, Renata, Edivânia, Leandro que contribuíram de forma direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos momentos de descontração!

À profa Dra Anne Hélène Fostier por contribuir no desenvolvimento deste trabalho.

À EMBRAPA por nos conceder as amostras de solo, o que tornou possível a realização de parte deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, pela oportunidade concedida.

À CPG do Instituto de Química/UNICAMP pela atenção e dedicação com que se dirige aos alunos.

Aos funcionários do Instituto de Química/UNICAMP pela prestação de serviços.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

CURRICULUM VITAE

Nome: Keity Margareth Doretto
e-mail: keitymd@gmail.com
currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/3350168147501668>

Formação Acadêmica

- 2008 - 2012 Doutorado em Química Analítica. Instituto de Química/Unicamp, IQ/UNICAMP, Brasil.
Título: Desenvolvimento de métodos visando a quantificação de sulfonamidas em medicamentos de uso veterinário e estudos de sorção/dessorção em solos.
Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath.
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil
- 2006 - 2008 Mestrado em Química Analítica. Instituto de Química/Unicamp, IQ/UNICAMP, Brasil.
Título: Síntese e caracterização do antimoniato de meglumina usado no tratamento de leishmaniose e desenvolvimento de métodos para especiação de antimônio.
Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath.
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil
- 2002 - 2005 Graduação em Bacharel em Química. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/Araraquara, Brasil.

Artigos em revista científica indexada

- ❖ Doretto, K.M., Rath, S. Sorption of sulfadiazine on tropical soils. *Chemosphere*, Submetido, 2012.
- ❖ Martins, I., Canaes, L., Doretto, K.M., Rath, S. Boron-Doped Diamond Electrode Coupled to Liquid Chromatography: Application to Simultaneous Determination of Benzodiazepines. *Electroanalysis*, v. 22, p. 455-462, 2010.
- ❖ Codognoto, L. Winter, E., Doretto, K.M., Monteiro, G.B., Rath, S. Electroanalytical performance of self-assembled monolayer gold electrode for chloramphenicol determination. *Microchimica Acta*, v. 169, p. 345-351, 2010.
- ❖ Doretto, K.M., Gotardo, M.A., Pezza, H.R., Pezza, L. Desenvolvimento de um método reflectométrico ambientalmente mais amigável para a determinação de metoclopramida em formulações farmacêuticas. *Química Nova*, v. 33, p. 461-465, 2010.

Apresentação de trabalhos em eventos científicos

1. França, R.F., Doretto, K.M., Oliveira de, H.P.M., Rath, S., Codognoto, L. Avaliação da potencialidade dos eletrodos AuDTDPA e AuMMB no estudo eletroquímico de 4-

nitrofenol. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Águas de Lindóia. Anais do 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.

2. MARTINS, I., CANAES, L., DORETTO, K.M., RATH, S. Boron-Doped diamond electrode coupled to liquid chromatography: application to simultaneous determination of benzodiazepines in pharmaceuticals preparations. In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (Cifarp), Ribeirão Preto, 2009.

3. Doretto, K.M. ; Rath, S. Determinação de Sb(V) na presença de ácido clorânico por voltametria adsortiva de redissolução. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), João Pessoa. Anais do 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.

4. Gotardo, M. A., Doretto, K.M., Pezza, H. R., Pezza, L. Determinação de metoclopramida em medicamentos utilizando a combinação spot - test por espectroscopia de reflectância difusa.; In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Águas de Lindóia. Anais do 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

5. Doretto, K.M., Gotardo, M. A., Pezza, H. R., Pezza, L. Determinação de metoclopramida em preparações farmacêuticas por espectroscopia de reflectância difusa. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara. Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2005.

Formação complementar

2011-2011: Extensão Universitária em Resíduos de Fármacos Veterinários em Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.

2007-2007: Química Analítica Forense. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Joao Pessoa, Brasil.

2005-2005: Química Forense. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2005-2005: Biotecnologia e Química Medicinal. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2003-2003: Produção de proteínas de interesse biotecnológico. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

2003-2003: Toxicologia ambiental para avaliar o meio ambiente. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2002-2002: Metrologia em Química e ISO-Guia 17025. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VISANDO A QUANTIFICAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO E ESTUDOS DE SORÇÃO/DESORÇÃO EM SOLOS

Antimicrobianos, entre eles as sulfonamidas, têm sido amplamente utilizados em medicina veterinária para fins terapêuticos e profiláticos. Uma vez excretados os fármacos e/ou metabólitos podem levar a contaminação do meio ambiente e estudos sobre o impacto ambiental ainda são escassos. Em adição, no Brasil, ainda não existe uma fiscalização de medicamentos veterinários. A não conformidade dos medicamentos reflete diretamente na saúde animal, como também é um tópico relevante quanto à segurança alimentar. Assim sendo, métodos foram desenvolvidos e validados para a determinação de sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX) em medicamentos de uso veterinário por cromatografia líquida de alta eficiência associada a um detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD). Os resultados obtidos indicam a necessidade de controle de qualidade dos fármacos de uso veterinário comercializados no Brasil. Ainda, o trabalho estudou a sorção da SDZ, SDM e SQX em quatro solos característicos do Estado de São Paulo. Os estudos foram conduzidos conforme recomendação do Guia OECD 106. As sulfonamidas foram quantificadas nas soluções de solo por um método HPLC-DAD previamente validado. Os dados de adsorção/dessorção das sulfonamidas nos quatro solos foram ajustados com isotermas de Freundlich na forma linear ou logarítmica. Um fenômeno de histerese de adsorção/dessorção foi evidente em todos os solos. Os baixos valores do coeficiente de Freundlich (K_F) obtidos sugerem fraca adsorção das sulfonamidas nos solos avaliados e, portanto, estas tendem a ser lixiviadas e, por sua vez apresentam potencial para contaminar águas superficiais e subterrâneas.

Palavras chave: Antimicrobianos, sulfonamidas, Isoterma de Freundlich, medicamentos veterinários, solos tropicais.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF METHODS AIMING THE QUANTIFICATION OF SULFONAMIDES IN VETERINARY DRUGS AND STUDIES OF ADSORPTION/DESORPTION IN SOILS

Antimicrobials, including sulfonamides, have been widely used in veterinary medicine for therapeutic and prophylactic purposes. Once excreted, drugs and/or metabolites can contaminate the environment. Environmental impact studies are still scarce. In addition, in Brazil, there is no surveillance of veterinary medicines. The poor quality of drugs may reflect directly on animal health and is also a topic relevant to food safety. Therefore, methods were developed and validated for the determination of sulfadiazine (SDZ), sulfadimethoxine (SDM) and sulfaquinoxaline (SQX) in veterinary drugs, using high performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector (HPLC-DAD). The obtained results indicate the need for a quality control program of veterinary drugs commercialized in Brazil. Moreover, the present work aimed to study the sorption of sulfonamides (SDZ, SDM and SQX) in four characteristic soils of the State of São Paulo. The studies were conducted as recommended by the OECD Guidelines 106. The sulfonamides were quantified in the soil solutions by a previously validated HPLC-DAD method. Adsorption/desorption data of sulfonamides in soils were fitted to Freundlich isotherms in the linear or logarithmic forms. A hysteresis of adsorption/desorption was evident in all four soils evaluated. The low values of the Freundlich coefficient (K_F) obtained suggest weak adsorption of sulfonamides in soils, and therefore they tend to be leached and present high potential to contaminate surface and groundwater.

Keywords: Antimicrobials, sulfonamides, Freundlich isotherms, veterinary medicines, tropical soils.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxv
LISTA DE TABELAS	xxix
LISTA DE FIGURAS.....	xxxí
PREFÁCIO.....	xxxvii
- CAPÍTULO I - VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS SULFONAMIDAS: SULFADIAZINA (SDZ), SULFADIMETOXINA (SDM) E SULFAQUINOXALINA (SQX) EM FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO	1
I.1. INTRODUÇÃO	3
I.1.1. FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO	3
I.1.2. SULFONAMIDAS	6
<i>I.1.2.1. Um breve histórico: A descoberta das sulfonamidas</i>	<i>6</i>
<i>I.1.2.2. Mecanismo de ação e resistência bacteriana.....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.2.3. Propriedades físico-químicas das sulfonamidas.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.2.4. Uso de sulfonamidas na produção animal</i>	<i>11</i>
I.1.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO	14
I.1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	15
<i>I.1.4.1. Parâmetros analíticos para validação de métodos.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.4.1.1. Efeito matriz e seletividade.....</i>	<i>19</i>
<i>I.1.4.1.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade.....</i>	<i>21</i>
<i>I.1.4.1.5. Precisão.....</i>	<i>23</i>
<i>I.1.4.1.6. Exatidão.....</i>	<i>24</i>
<i>I.1.4.1.7. Robustez</i>	<i>25</i>
I.2. OBJETIVOS.....	27

I.3. PARTE EXPERIMENTAL	27
I.3.1. Reagentes, Solventes e Padrões	27
I.3.2. Equipamentos	28
I.3.3. Materiais	29
<i>I.3.3.1 Colunas cromatográficas</i>	29
<i>I.3.3.2 Amostras</i>	29
I.3.4. Metodologia	30
<i>I.3.4.1. Preparo de soluções</i>	30
<i>I.3.4.2. Preparo de amostra</i>	31
<i>I.3.4.3. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfonamidas em fármacos de uso veterinário</i>	33
<i>I.3.4.3.1. Desenvolvimento do método cromatográfico e parâmetros de conformidade do sistema</i>	33
<i>I.3.4.3.2 Estudo da estabilidade das sulfonamidas: sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX)</i>	34
<i>I.3.4.3.3. Parâmetros de validação</i>	35
<i>I.3.4.4. Análise de medicamentos veterinários contendo sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina como principais ativos por HPLC- DAD</i>	39
I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
I.4.1. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfonamidas em fármacos de uso veterinário	40
<i>I.4.1.1. Otimização do método e parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico</i>	40
<i>I.4.1.2. Estabilidade das soluções de SDZ, SDM e SQX</i>	44

<i>I.4.1.3. Validação dos métodos para a quantificação das sulfonamidas sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX) em fármacos de uso veterinário</i>	46
<i>I.4.1.3.1. Seletividade</i>	47
<i>I.4.1.3.2. Curva analítica</i>	53
<i>I.4.1.3.3. Precisão</i>	55
<i>I.4.1.3.4. Exatidão</i>	56
<i>I.4.1.3.5. Robustez</i>	57
<i>I.4.1.4. Quantificação das sulfonamidas: sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX) em amostras comercialmente disponíveis de medicamentos de uso veterinário</i>	61
I.5. CONCLUSÕES	67
- CAPÍTULO II - ESTUDO DE ADSORÇÃO/DESSORÇÃO DAS SULFONAMIDAS: SULFADIAZINA (SDZ), SULFADIMETOXINA (SDM) E SULFAQUINOXALINA (SQX) EM SOLOS CARACTERÍSTICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO	69
II.1. INTRODUÇÃO	71
II.1.1. SOLO E SUAS CARACTERÍSTICAS	71
<i>II.1.1.1. Pedologia: Sistema de classificação dos solos brasileiros</i>	74
<i>II.1.1.2. Pedologia: Solos característicos do Estado de São Paulo</i>	76
II.1.2. RESÍDUO DE ANTIMICROBIANOS NO MEIO AMBIENTE E SUAS CONSEQUÊNCIAS	77
II.1.3. INTERAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS COM XENOBIÓTICOS	83
II.1.4. ESTUDO DA ADSORÇÃO/DESSORÇÃO DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS EM SOLOS	86
II.1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS EM MATRIZ SÓLIDA	91

II.1.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	93
<i>II.1.6.1. Efeito matriz e seletividade.....</i>	<i>93</i>
<i>II.1.6.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade.....</i>	<i>94</i>
<i>II.1.6.3. Limite de detecção (LOD).....</i>	<i>95</i>
<i>II.1.6.4. Limite de quantificação (LOQ).....</i>	<i>95</i>
<i>II.1.6.5. Precisão.....</i>	<i>96</i>
II.2. OBJETIVOS.....	97
II.3. PARTE EXPERIMENTAL	97
II.3.1. Reagentes e Padrões.....	97
II.3.2. Materiais	97
II.3.3. Equipamentos	98
II.3.4. Amostras de solos tropicais característicos do Estado de São Paulo .	98
II.3.5. Metodologia	101
<i>II.3.5.1. Preparo de soluções.....</i>	<i>101</i>
<i>II.3.5.2. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em soluções de solo provenientes dos estudos de adsorção e dessorção....</i>	<i>101</i>
<i>II.3.5.2.1. Desenvolvimento do método cromatográfico e parâmetros de conformidade do sistema</i>	<i>101</i>
<i>II.3.5.2.2. Parâmetros de validação</i>	<i>102</i>
<i>II.3.5.3. Estudo da adsorção e dessorção de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em amostras de solos tropicais característicos do Estado de São Paulo</i>	<i>103</i>
<i>II.3.5.3.1. Estudos preliminares: Otimização das condições a serem empregadas nos estudos de adsorção e dessorção das sulfonamidas em solos.....</i>	<i>104</i>

<i>II.3.5.3.2. Estudos de adsorção e dessorção</i>	104
II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
II.4.1. Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em soluções de solo provenientes dos estudos de adsorção e dessorção.....	106
II.4.2. Estudo de adsorção/dessorção das sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) em solos do Estado de São Paulo.....	108
<i>II.4.2.1. Estudos preliminares</i>	108
<i>II.4.2.2. Validação do método</i>	111
<i>II.4.2.3. Isotermas de adsorção e dessorção da SDZ, SDM e SQX nos solos N1, N2, S1 e S2</i>	115
II.5. CONCLUSÕES	130
- CAPÍTULO III - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
Anexo 1	151
Anexo 2	157
Anexo 3	163

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ambiente âmbar
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fúlvico
AH	Ácido húmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Ambiente transparente
CPV	Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários
CTC	Capacidade de troca catiônica
DAD	Detecção por arranjos de diodos (<i>diode-array detection</i>)
DFIP	Departamento de Fiscalização de Insumos e Produtos Agropecuários
EC ₅₀	Metade da concentração máxima efetiva (<i>half maximal effective concentration</i>)
EMEA	Agência Europeia de Medicina (<i>European Medicine Agency</i>)
EPA	Agência de Proteção Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FA	Fase aquosa
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Administração de Drogas e Alimentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FE	Fase estacionária
FO	Fase orgânica
G	Geladeira
H	Histerese
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização (<i>International Conference on Harmonization</i>)

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
K _{CO}	Coeficiente normalizado pelo carbono orgânico
K _D	Coeficiente de distribuição
K _F	Coeficiente de Freundlich
LLE	Extração líquido-líquido (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Limite de detecção (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (<i>limit of quantification</i>)
MAE	Extração assistida por micro-ondas (<i>microwave assisted extraction</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MHLW	Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar (<i>Ministry of Health, Labour and Welfare</i>)
MS	Espectrometria de Massas (<i>mass spectrometry</i>)
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
PLE	Extração líquida pressurizada (<i>pressurized liquid extraction</i>)
RSD	Estimativa do desvio padrão relativo (<i>relative standard deviation</i>)
SA	Sulfonamida
SDZ	Sulfadiazina
SDM	Sulfadimetoxina
SE	Solução estoque
SFE	Extração com fluído supercrítico (<i>supercritical fluid extraction</i>)
SH	Substância húmica
SiBCS	Sistema Brasileiro de Classificação de Solos
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SMX	Sulfametoxazol
SMZ	Sulfametazina
SPE	Extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
SQX	Sulfaquinoxalina
STZ	Sulfatiazol

TMTP	Trimetoprima
UV	Espectro de ondas eletromagnéticas da região do ultravioleta
VICH	Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos Veterinários (<i>Veterinary International Conference on Harmonization</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. 1. Propriedades físico-químicas das sulfonamidas (SA): sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina.....	11
Tabela I.1. 2. Classificação dos testes segundo sua finalidade (ANVISA, 2003; MAPA, 2011 ^o).....	18
Tabela I.1. 3. Ensaio que devem ser estudados na validação do método analítico, de acordo com sua finalidade e categoria (ANVISA, 2003; MAPA, 2011 ^o).....	19
Tabela I.3. 1. Informações básicas sobre as amostras de medicamentos veterinários analisadas no presente trabalho.....	30
Tabela I.3. 2. Condições de estocagem para o estudo de estabilidade dos fármacos em solução.	35
Tabela I.3. 3. Fatores com suas respectivas variáveis que foram considerados na determinação da robustez do método desenvolvido para SDZ, SDM e SQX bem como os seus 8 experimentos.....	38
Tabela I.4. 1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para as sulfonamidas (SA): SDZ, SDM e SQX.....	43
Tabela I.4. 2. Condições experimentais utilizadas para avaliar a degradação dos fármacos.....	48
Tabela I.4. 3. Parâmetros de validação dos métodos de determinação de sulfonamidas em medicamentos de uso veterinário por HPLC-DAD.	54
Tabela I.4. 4. Valores obtidos para os ensaios de precisão e exatidão das sulfonamidas pelo método HPLC-DAD.	57
Tabela I.4. 5. Fatores avaliados no ensaio de robustez para SDZ.	58
Tabela I.4. 6. Teores médios de SDZ, SDM e SQX determinados em amostras de medicamentos de uso veterinário por padronização externa ou por adição de padrão.	66
Tabela II.3. 1. Propriedades físico-químicas dos solos N1, N2, S1 e S2.	100
Tabela II.4. 1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para as sulfonamidas (SA): SDZ, SDM e SQX.....	107

Tabela II.4. 2. Parâmetros de validação dos métodos de determinação de sulfonamidas em soluções de solo por HPLC-DAD.	114
Tabela II.4. 3. Precisão do método para SDZ, SDM e SQX nos solos em estudo na etapa de adsorção.....	115
Tabela II.4. 4. Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich (K_F e $1/n$), coeficiente de distribuição (K_D), coeficiente de correlação (r), coeficiente normalizado pelo carbono orgânico (K_{CO}) e histerese para a SDZ nos quatro diferentes solos.	122
Tabela II.4. 5. Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich (K_F e $1/n$), coeficiente de distribuição (K_D), coeficiente de correlação (r), coeficiente normalizado pelo carbono orgânico (K_{CO}) e histerese para a SDM nos quatro diferentes solos.	123
Tabela II.4. 6. Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich (K_F e $1/n$), coeficiente de distribuição (K_D), coeficiente de correlação (r), coeficiente normalizado pelo carbono orgânico (K_{CO}) e histerese para a SQX nos quatro diferentes solos.	124

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. 1. Faturamento do mercado veterinário nacional. Fonte: (SINDAN, 2012).....	4
Figura I.1. 2. Faturamento do mercado veterinário nacional por espécie animal. Fonte: (SINDAN, 2012).	5
Figura I.1. 3. Metabolismo do prontossil.....	8
Figura I.1. 4. Estrutura molecular da sulfonamida.	10
Figura I.1. 5. Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas.	10
Figura I.1. 6. Produtos veterinários sulfonamídicos com licença vigente (MAPA, 2012).....	12
Figura I.1. 7. Números de medicamentos contendo sulfonamidas como princípio ativo comercializados no Brasil, categorizados por formas farmacêuticas e número de empresas (MAPA, 2012).....	13
Figura I.3. 1. Estrutura molecular das sulfonamidas e trimetoprima.....	28
Figura I.4. 1. Cromatograma característico das sulfonamidas e trimetoprima: 1) Sulfadiazina (SDZ), 2) sulfatiazol (STZ), 3) trimetoprima (TMTP), 4) sulfametazina (SMZ), 5) sulfametoxazol (SMX), 6) sulfadimetoxina (SDM) e 7) sulfaquinoxalina (SQX), todas a 20 µg mL ⁻¹ . Condições cromatográficas: FE - XBridge™. Fase móvel - FO (0,1% v/v de ácido fórmico em MeOH, FA 0,1% v/v de ácido fórmico, pH 3,0). Eluição por gradiente - FO:FA 10:90 v/v para 38:62 v/v em 10 min; FO:FA 38:62 v/v por 10 a 14 min; voltando a proporção inicial FO:FA 10:90 v/v de 15 a 20 min. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 40 °C.....	42
Figura I.4. 2. Estabilidade da solução estoque (SE) de SDZ armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (SE _{AT}); âmbar (SE _{AA}) e em geladeira, 4 °C, em frasco transparente (SE _{GT}) e da solução de trabalho armazenadas à temperatura ambiente em frasco âmbar (S _{tr (AA)}).	45
Figura I.4. 3. Estabilidade da solução estoque (SE) de SDM armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (SE _{AT}); âmbar (SE _{AA}) e em	

geladeira, 4 °C, em frasco transparente (SE _{GT}) e da solução de trabalho armazenadas à temperatura ambiente em frasco âmbar (S _{tr (AA)}).	45
Figura I.4. 4. Estabilidade da solução estoque (SE) de SQX armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (SE _{AT}); âmbar (SE _{AA}) e em geladeira, 4-8 °C, em frasco transparente (SE _{GT}) e da solução de trabalho armazenadas à temperatura ambiente em frasco âmbar (S _{tr (AA)}).	46
Figura I.4. 5. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de SDZ submetidas às condições apresentadas na Tabela I.4.2, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: FE - XBridge™. Fase móvel - FO (0,1% v/v de ácido fórmico em MeOH), FA (solução 0,1% v/v de ácido fórmico). Eluição por gradiente: 12% (v/v) de FO e 88% de FA de 0 a 8 minutos; sendo mudado para 85% (v/v) de FO e 15% (v/v) de FA de 9 a 14 minutos; voltando à proporção inicial de 15 a 20 minutos. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 40 °C. Concentração de SDZ: 15 µg mL ⁻¹ ..	49
Figura I.4. 6. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de SDM submetidas às condições apresentadas na Tabela I.4.2, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: FE - XBridge™. Fase móvel - FO (0,1% v/v de ácido fórmico em MeOH), FA (solução de 0,1% v/v de ácido fórmico). Eluição isocrática - FO:FA 40:60 v/v. Vazão: 0,7 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 40 °C. Concentração de SDM: 10 µg mL ⁻¹	50
Figura I.4. 7. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de SQX submetidas às condições apresentadas na Tabela I.4.2, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: FE - XBridge™. Fase móvel - FO (0,1% v/v de ácido fórmico em MeOH, FA 0,1% v/v de ácido fórmico, pH 3,0). Eluição isocrática - FO:FA 40:60 v/v. Vazão: 0,7 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 40 °C. Concentração de SQX: 10 µg mL ⁻¹	52
Figura I.4. 8. Curvas analíticas (A) e gráfico de resíduos (B) para SDZ (preto), SDM (vermelho) e SQX (azul).....	54

Figura I.4. 9. Gráfico de pareto padronizado para um planejamento fatorial fracionário com oito experimentos (N = 8) e sete variáveis; $E_{\text{crítico}}$: valor crítico do efeito.	60
Figura I.4. 10. Cromatogramas de amostras de medicamento veterinário contendo SD e SQX como principal ativo e compostos em como TMTP (trimetoprima) e diaveridina em associação.....	62
Figura II.1. 1. Triângulo textural de um solo de acordo com a porcentagem de silte, areia e argila. IBGE (2007).	74
Figura II.1. 2. Mapa pedológico do Estado de São Paulo com os quatro principais tipos de solo.	77
Figura II.1. 3. Possíveis vias de exposição ambiental devido ao uso de medicamentos veterinários.....	79
Figura II.1. 4. Estrutura proposta para os ácidos húmicos (Schulten, 1995).	84
Figura II.4. 1. Tempo de equilíbrio aparente da SDZ, SDM e SQX nos solos N1, N2, S1 e S2.....	110
Figura II.4. 2. (A) Cromatogramas característicos da sulfadiazina (SDZ), matriz solo N1, N2, S1 e S2 (razão 1:1) com eluição isocrática: FO:FA 10:90 (v/v), vazão 0,7 mL min ⁻¹ ; (B) sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX), matriz solo N1, N2, S1 e S2 (razão 1:2) com eluição isocrática na proporção FO:FA 30:70 (v/v), vazão 1,0 mL min ⁻¹ . A concentração das três sulfonamidas foi mantida em 0,1 µg mL ⁻¹ . Condições cromatográficas: FE: XBridge, Fase móvel: FO (0,1% (v/v) de ácido fórmico em MeOH, FA 0,1% (v/v) de ácido fórmico, pH 3,0). Volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna 40 °C.	112
Figura II.4. 3. Isotermas de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDZ no solo com alto teor de areia (N1).	116
Figura II.4. 4. Isotermas de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDZ nos solos com alto teor de argila (N2, S1 e S2).	117
Figura II.4. 5. Isoterma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDM no solo com maior teor de areia (N1). ..	118

Figura II.4. 6. Isoterma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDM nos solos com maior teor de argila (N2, S1 e S2).	119
Figura II.4. 7. Isoterma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SQX nos solos com maior teor de argila (N2, S1 e S2).	120
Figura II.4. 8. Isoterma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SQX no solo com maior teor de areia (N1)....	121
Figura A1. 1. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).	151
Figura A1. 2. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).	151
Figura A1. 3. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	152
Figura A1. 4. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	152
Figura A1. 5. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	153
Figura A1. 6. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	153
Figura A1. 7. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).....	154
Figura A1. 8. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,595 minutos após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).	154
Figura A1. 9. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).....	155
Figura A1. 10. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,595 minutos após 24 horas do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).	155

Figura A1. 11. Espectro referente à SDZ (15 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em temperatura a 60 °C.....	156
Figura A1. 12. Espectro referente à SDZ (15 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em temperatura a 60 °C.....	156
Figura A2. 1. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).	157
Figura A2. 2. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).	157
Figura A2. 3. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em HCl 0,1mol L ⁻¹	158
Figura A2. 4. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em HCl 0,1mol L ⁻¹	158
Figura A2. 5. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em NaOH 0,1mol L ⁻¹	159
Figura A2. 6. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em NaOH 0,1mol L ⁻¹	159
Figura A2. 7. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).....	160
Figura A2. 8. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,542 minutos após uma hora do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).	160
Figura A2. 9. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após 24 hora do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).....	161
Figura A2. 10. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,542 minutos após 24 horas do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).	161
Figura A2. 11. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em temperatura a 60 °C.....	162
Figura A2. 12. Espectro referente à SDM (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em temperatura a 60 °C.....	162

Figura A3. 1. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).	163
Figura A3. 2. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).	163
Figura A3. 3. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em HCl 0,1mol L ⁻¹	164
Figura A3. 4. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em HCl 0,1mol L ⁻¹	164
Figura A3. 5. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em NaOH 0,1mol L ⁻¹	165
Figura A3. 6. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em NaOH 0,1mol L ⁻¹	165
Figura A3. 7. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).	166
Figura A3. 8. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,549 minutos após uma hora do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).	166
Figura A3. 9. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após 24 hora do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).	167
Figura A3. 10. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,549 minutos após 24 horas do seu preparo em H ₂ O ₂ 3% (v/v).	167
Figura A3. 11. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após uma hora do seu preparo em temperatura a 60 °C.	168
Figura A3. 12. Espectro referente à SQX (10 µg mL ⁻¹) após 24 horas do seu preparo em temperatura a 60 °C.	168

PREFÁCIO

M

edicamentos veterinários, entre esses antimicrobianos, tem sido amplamente empregados na medicina veterinária e na cadeia de produção animal. Seu uso tem permitido aumentar consideravelmente a produtividade e alavancado o agronegócio a nível nacional. No entanto, até então não existe fiscalização da qualidade dos medicamentos veterinários no Brasil. A não conformidade dos medicamentos pode prejudicar não somente a saúde animal, mas também a segurança dos alimentos, quando permanecem resíduos de fármacos veterinários nos produtos acima dos valores considerados seguros nos produtos oriundos de animais tratados.

Além da falta de controle nos medicamentos comercializados no País é associada a este fato a problemática do impacto ambiental que estes podem ocasionar. Os antimicrobianos administrados aos animais são em sua grande parte excretados de forma não metabolizada e podem, assim, contaminar o meio ambiente, em particular solos e águas. Estudos sobre a mobilidade de fármacos veterinários no meio ambiente tem sido realizado em países de clima temperado. Contudo, esses dados não podem ser extrapolados para países de clima tropical, onde as condições climáticas e composição dos solos são diferentes. Sendo assim, a falta de controle de qualidade de medicamentos veterinários, escassez de estudos sobre o impacto ambiental e a suposição que antimicrobianos podem levar a seleção de micro-organismos resistentes motivaram o desenvolvimento desta tese. A classe dos antimicrobianos selecionada para ser investigada foi a das sulfonamidas, uma vez que estes são amplamente empregados na terapia e profilaxia de animais destinados a produção alimentar.

Para facilitar a compreensão dos resultados e discussões desta tese, a mesma está apresentada em três capítulos. No **Capítulo I** é apresentado o desenvolvimento e validação de métodos para a quantificação das sulfonamidas: sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX) em medicamentos de uso veterinário. No **Capítulo II** é descrito o comportamento da sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX) em solos do Estado de São Paulo mediante estudos de adsorção/dessorção. No **Capítulo III** são apresentadas as referências bibliográficas citadas nos capítulos I e II da tese.

- CAPÍTULO I -

*VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO
DAS SULFONAMIDAS: SULFADIAZINA (SDZ),
SULFADIMETOXINA (SDM) E SULFAQUINOXALINA
(SQX) EM FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO*

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO

Medicamentos de uso veterinário tem sido utilizados em grandes quantidades na produção animal, principalmente para a prevenção e tratamento de doenças. O uso de medicamentos veterinários na agropecuária tem permitido aumentar a produtividade e a competitividade do agronegócio a nível nacional e internacional.

O Brasil apresenta uma ampla atividade pecuária, sendo considerado, desde 2004, o maior exportador de carne bovina. As estatísticas preveem que a exportação de carne bovina e de frango crescerá nos próximos anos. A produção brasileira de carnes bovina, suína e de aves em 2010 foi estimada em 24,5 milhões de toneladas, sendo que 75% dessa produção foi consumida internamente no país. A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial. Já a carne de frango terá 48,1% das exportações mundiais e a participação da carne suína será de 14,2% (MAPA, 2011^a).

Essas estimativas indicam que o Brasil pode manter a posição de maior exportador mundial de carnes bovina e de frango (MAPA, 2011^a). As regulamentações para promover a entrada de produtos alimentícios no mercado internacional vêm se tornando cada vez mais rígidas e a não conformidade destes produtos pode resultar em interdição e prejuízos as indústrias pecuaristas brasileiras.

O aumento significativo na produção de alimento de origem animal somente tem sido possível pelo emprego de medicamentos veterinários durante o manejo.

Poucos países no mundo dispõem de estatísticas abrangentes sobre a produção, a venda, a utilização e a dosagem dos fármacos veterinários utilizados nas diversas criações de animais. Entretanto, é estimado que mais de 70% dos fármacos

utilizados na medicina veterinária sejam antimicrobianos (Thiele-Bruhn, 2003). Nos EUA, 80% dos antimicrobianos vendidos são usados para o gado. Em abril de 2012, a Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) decretou uma proibição parcial de cefalosporinas na ração animal, mas liberou o uso para tratamento de doenças dos animais. Os animais consumiram 13,2 milhões de quilos de antimicrobianos em 2010 nos EUA (FDA, 2012).

No Brasil o mercado de medicamentos veterinários vem aumentando (**Figura I.1.1**) e movimentou em 2011 cerca de três bilhões de reais (SINDAN, 2012).



Figura I.1. 1. Faturamento do mercado veterinário nacional. Fonte: (SINDAN, 2012).

Pode ser observado que mais de 50% do faturamento do mercado veterinário brasileiro é proveniente da bovinocultura (**Figura I.1.2**), uma vez que é um dos principais destaques atuais do agronegócio brasileiro no cenário mundial.

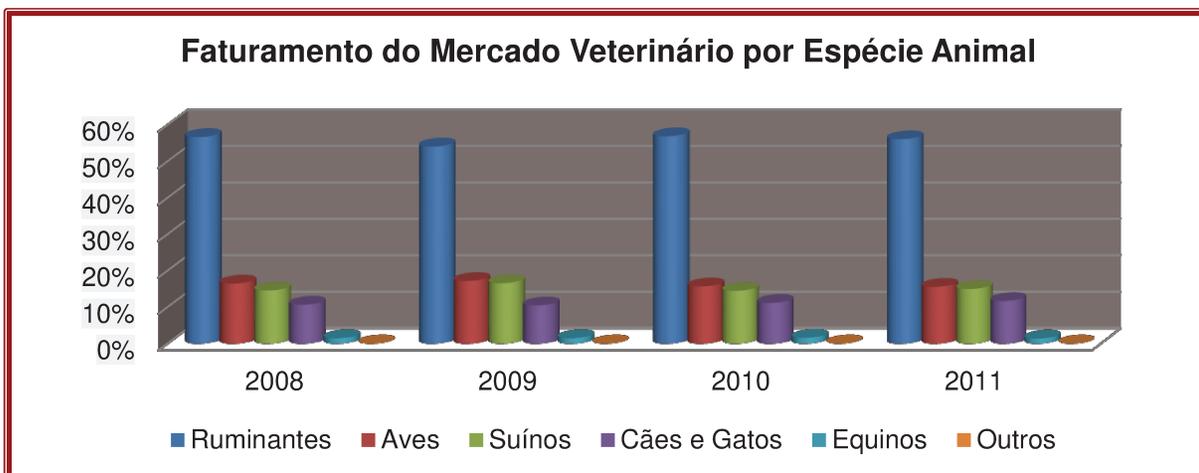


Figura I.1. 2. Faturamento do mercado veterinário nacional por espécie animal. Fonte: (SINDAN, 2012).

Os fármacos utilizados nos medicamentos pertencem a diferentes classes terapêuticas, tais como: antimicrobianos, antiparasitários, tireostáticos, anti-inflamatórios, anestésicos, antissépticos, entre outros. Dentre estes, os biológicos (vacinas), antiparasitários e os antimicrobianos tem sido os de maior destaque com faturamentos de aproximadamente de 30%, 24% e 20%, respectivamente. Ao nível mundial, o mercado de antimicrobianos movimentou US\$ 42 bilhões em 2009, representando 5% do mercado farmacêutico mundial. Nos últimos cinco anos foi verificado um aumento anual de 4%. No Brasil, 1/3 do mercado de medicamentos veterinários é referente à comercialização de antimicrobianos (SINDAN 2012).

No Brasil, o mercado de medicamentos veterinários é um dos maiores do mundo e continua em expansão. A regulamentação deste mercado, desde os aspectos de registro e licença para produção até a análise fiscal, é exercida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio do Departamento de Fiscalização de Insumos e Produtos Agropecuários (DFIP) e de sua Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV).

Cabe destacar que o Brasil ainda não fiscaliza os medicamentos veterinários. Entretanto, em 27/12/2010 o MAPA (2011^b) publicou a portaria nº 577 que estabelece os requisitos específicos para a habilitação de Laboratórios Analíticos para Controle de Medicamentos Veterinários e Produtos Afins, integrantes da Rede

Nacional de Laboratórios Agropecuários, em complemento à Instrução Normativa nº 01, de 16 de janeiro de 2007, e o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos e Controle de Qualidade – Medicamentos Veterinários, Farmoquímicos, Fármacos e outras substâncias em Produtos para Alimentação Animal e Matrizes de Origem Biológica.

Os medicamentos prioritários a serem fiscalizados pelo Ministério, por meio do Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo em Campinas, são os antiparasitários contendo avermectinas e antimicrobianos das classes das fluoroquinolonas. Os métodos a serem empregados foram os validados no Laboratório de Bioanalítica Paracelsus do Instituto de Química, Unicamp. Também, na lista prioritária de fármacos a serem fiscalizados, encontram-se os antimicrobianos da classe das sulfonamidas.

As sulfonamidas tem sido amplamente empregadas na medicina veterinária. Esta classe de fármacos sintéticos teve um uso intenso na era pré-penicilina e ainda durante muitas décadas após a introdução das penicilinas e demais classes de antibióticos e fármacos sintéticos.

I.1.2. SULFONAMIDAS

Desde a sua descoberta as sulfonamidas encontraram várias aplicações. Antes da descoberta da penicilina e de outros antimicrobianos, as sulfonamidas constituíram o suporte da quimioterapia antibacteriana e até hoje são amplamente prescritas na terapia de doenças causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

I.1.2.1. Um breve histórico: A descoberta das sulfonamidas

Considerável progresso tem sido feito antes de 1930 para o desenvolvimento de bactericidas. Os agentes disponíveis para o tratamento de muitas doenças de origem bacteriana eram limitados. Doenças como pneumonia, meningite, disenteria,

entre outras, não poderiam ser tratadas com eficácia até a descoberta que marcou a época das sulfonamidas (Kar, 2005).

Antes de 1932, nenhum produto químico sintético existia para o tratamento de infecções bacterianas. Uma nova era na medicina foi anunciada por Gerhard Domagk. Foi Domagk que iniciou uma busca por substâncias que inibissem e/ou matassem bactérias dentro do corpo humano.

Gerhard Johannes Paul Domagk (1895 – 1964) foi um bacteriologista e patologista alemão que estava cursando medicina na Universidade de Kiel quando a Primeira Guerra Mundial (1914 – 1918) eclodiu e ele entrou para o exército alemão. Ele foi ferido e, mais tarde, foi enviado para se juntar ao Serviço Sanitário e servir, entre outros lugares, os hospitais de cólera na Rússia. Em 1918, retomou seus estudos na Universidade de Kiel e recebeu seu diploma em medicina em 1921 (Domagk, 1939).

Domagk trabalhou para IG Farben, empresa química alemã. Na Farben, ele atuou como diretor do Laboratório de Patologia e Bacteriologia Experimental. Domagk examinou as propriedades de corantes sintetizados por seus colegas Fritz Mietsch e Joseph Klarer, testando-os para o uso como medicamentos. Em 1932, Domagk fez a descoberta da qual o seu nome é conhecido e, com tal descoberta, foi agraciado pelo Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1939, ou seja, o fato de um corante vermelho em que foi dado o nome de “prontosil rubrum” protegeu camundongos e coelhos contra doses letais de estafilococos e estreptococos hemolíticos (Domagk, 1939).

Sem saber se Prontosil seria igualmente eficaz em seres humanos, surgiu a Domagk uma oportunidade inesperada para testar o corante em sua própria casa. Sua filha ficou muito doente com uma infecção estreptocócica e, em desespero, Domagk deu a ela uma dose de Prontosil. Ela teve uma recuperação completa, mas Domagk omitiu mencionar a recuperação de sua filha no relatório sobre o efeito da droga; esperando até 1935 quando os resultados estavam disponíveis a partir de médicos que tinham testado o novo medicamento em pacientes. Em 1936, Prontosil foi dado ao filho de Franklin Delano Roosevelt (presidente dos Estados Unidos de

1933 – 1945) e, então, Franklin D. Roosevelt Jr. rapidamente se recuperou de uma infecção estreptocócica (Iyer, 2008).

Prontosil tinha propriedades bacteriostáticas *in vivo*, porém *in vitro* nenhuma atividade antibacteriana foi observada. A partir disso, foi verificado que o Prontosil não foi de fato o agente antibacteriano. Em vez disso, foi observado que o corante foi metabolizado por bactérias presentes no intestino do animal testado, gerando um produto chamado sulfanilamida, sendo este o verdadeiro agente bacteriostático (**Figura I.1.3**). Assim, Prontosil foi o primeiro exemplo de uma pró-droga derivado da sulfanilamida (*p*-aminobenzenosulfonamida) que o químico vienense, Paul Gelmo, sintetizou em 1908. A sulfanilamida foi o primeiro antibacteriano sintético ativo contra uma ampla variedade de infecções. Deste modo, outras sulfonamidas foram sintetizadas provando a eficácia contra organismos Gram-positivos (Drews, 2000).

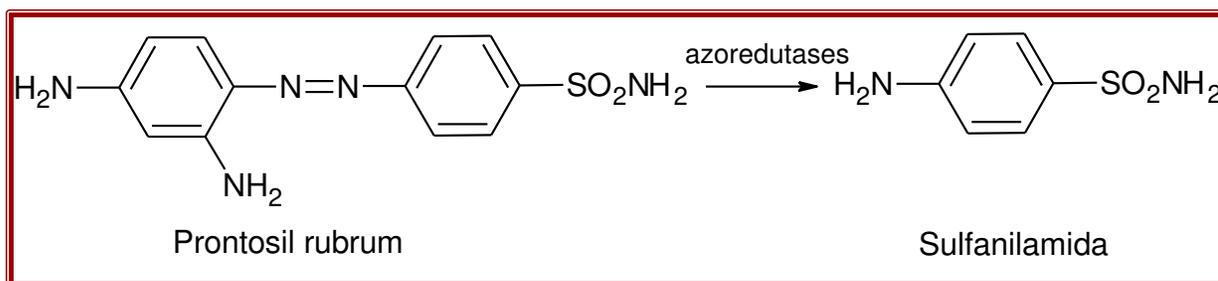


Figura I.1. 3. Metabolismo do prontosil.

1.1.2.2. Mecanismo de ação e resistência bacteriana

As sulfonamidas inibem a multiplicação de bactérias (agente bacteriostático) agindo como inibidores competitivos do ácido *p*-aminobenzóico no ciclo do metabolismo do ácido fólico. O ácido fólico é requerido para o crescimento normal das células bacterianas, bem como das células de mamíferos. Os mamíferos obtêm este ácido na forma de folato por meio da dieta alimentar. As bactérias, no entanto, não tem meios de obter o ácido fólico e necessitam sintetizar este componente por meio de uma reação que envolve o ácido *p*-aminobenzóico e ácido glutâmico. As

sulfonamidas são análogas do ácido *p*-aminobenzóico e, portanto, exercem seu efeito bacteriostático por meio de antimetabólito (Fuchs & Elsner, 2003).

As bactérias podem adquirir resistência às sulfonamidas principalmente por três mecanismos: 1) alteração da permeabilidade da parede celular regulada por expressão gênica, com o efeito final de permitir a entrada de ácido fólico pré-formado para o meio intracelular; 2) aumento da produção enzimática; e 3) aumento da produção de metabólito essencial (Acar & Moulin, 2006).

O desenvolvimento de resistência é um fenômeno irreversível e pode ser induzido por baixos níveis de exposição aos antimicrobianos (Jorgensen & Halling-Sørensen, 2000). Geralmente a resistência a uma determinada sulfonamida implica em resistência cruzada a todos os compostos do grupo. As medidas recomendadas para evitar o surgimento desta resistência consistem basicamente em abolir o uso indiscriminado das sulfonamidas, iniciar a terapia precocemente na evolução de infecções agudas e estabelecer e manter concentrações eficazes de droga nos tecidos do animal em tratamento (Fuchs & Elsner, 2003).

1.1.2.3. Propriedades físico-químicas das sulfonamidas

Sulfonamidas são antimicrobianos sintéticos e importantes agentes bacteriostáticos. No geral, as sulfonamidas consistem de um anel benzeno, um radical amina (-NH₂) e um grupo sulfonamida (-SO₂NH-) (**Figura 1.1.4.**). São anfotéricas com grupos funcionais que podem doar ou receber um próton. As transferências de prótons ocorrem por meio da protonação ou desprotonação dos grupos funcionais dependendo do pH da solução. Assim, uma sulfonamida pode ser catiônica, neutra ou aniônica dependendo do pH da solução em relação aos valores de pK_a da sulfonamida em questão. Os grupos amina e sulfonamida devem estar na posição *para* um em relação ao outro para a sulfonamida possuir atividade antibacteriana (Sarmah *et al.*, 2006).

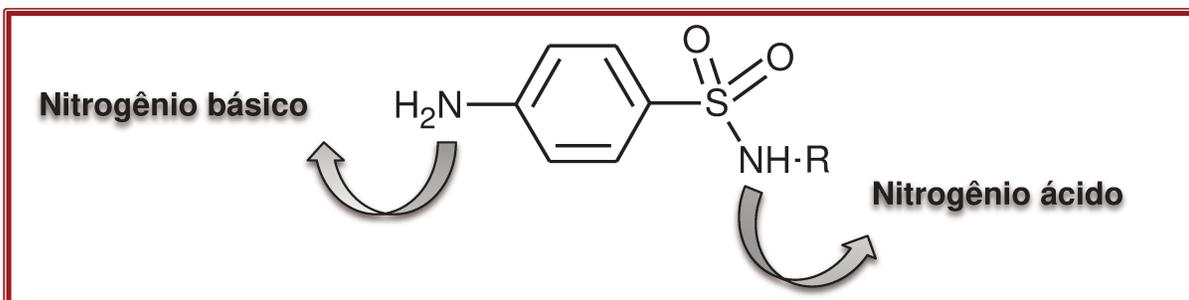


Figura I.1. 4. Estrutura molecular da sulfonamida.

Assim, o primeiro equilíbrio de dissociação é referente ao grupo amina ($\text{pK}_{\text{a}1}$) o qual é protonado em pH 2 e o segundo equilíbrio de dissociação é referente a amida ($\text{pK}_{\text{a}2}$) que é desprotonado em $\text{pH} > \text{pK}_{\text{a}2}$. Por esta razão, as sulfonamidas são carregadas positivamente sob condições ácidas quando $\text{pH} < \text{pK}_{\text{a}1}$, neutra quando $\text{pK}_{\text{a}1} < \text{pH} < \text{pK}_{\text{a}2}$ e carregada negativamente em $\text{pH} > \text{pK}_{\text{a}2}$. A **Figura I.1.5** mostra o equilíbrio de dissociação das sulfonamidas.

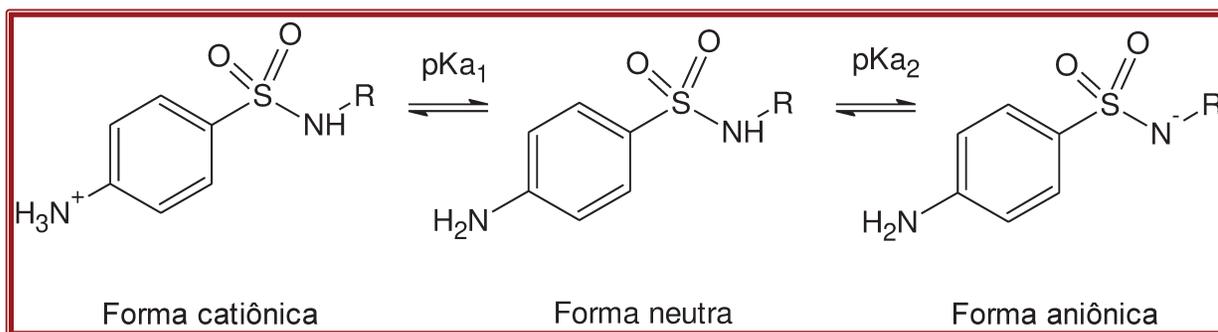


Figura I.1. 5. Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas.

Embora as sulfonamidas sejam anfotéricas, elas geralmente funcionam como ácido orgânicos fracos em valores de pH fisiológico (entre 4,5-6,0). Conseqüentemente são vistas como sais de sódio que aumentam sua solubilidade com o aumento do pH. A solubilidade das sulfonamidas pode variar na faixa de 0,1 – 8 g L^{-1} (Sarmah *et al.*, 2006; Thiele-Bruhn, 2003). A **Tabela I.1.1** apresenta as propriedades físico-químicas das sulfonamidas em estudo.

Tabela I.1. 1. Propriedades físico-químicas das sulfonamidas (SA): sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina.

SA	MM (g mol ⁻¹)	pK _{a1} /pK _{a2}	S (mg L ⁻¹)	PV (mmHg)	K _{ow}	Constante de Henry (atm m ³ mol ⁻¹)
SDZ	250,3	1,6 / 6,8	77	4,31 10 ⁻⁸	0,813	1,60 10 ⁻¹⁰
SDM	310,3	3,0 / 6,2	340	1,60 10 ⁻⁹	42,7	1,30 10 ⁻¹⁴
SQX	300,3	2,3 / 6,0	120	3,00 10 ⁻¹⁰	47,9	6,68 10 ⁻¹¹

Fonte: CAS, 2012; Thiele-Bruhn *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2008.

MM: Massa Molar; Constante de basicidade/acidez; S: Solubilidade; PV: Pressão de vapor; K_{ow}: Coeficiente de partição octanol-água.

1.1.2.4. Uso de sulfonamidas na produção animal

A produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio brasileiro. A utilização de medicamentos com fins terapêuticos e profiláticos é comumente utilizada com a finalidade de assegurar a produtividade e a competitividade do setor.

As sulfonamidas tem sido aliadas dos produtores rurais uma vez que podem atuar no tratamento de várias doenças causadas por micro-organismos diversos. Além de afetarem bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e protozoários são indicadas também para o tratamento e prevenção de infecções intestinais e respiratórias, artrites, pododermatites, mastites e metrites, meningoencefalites e infecções urinárias. As sulfonamidas podem ser utilizadas em associações a fármacos como diaminopirimidinas (trimetoprima e análogos). Utilizadas isoladamente sem trimetoprima tem efeito bacteriostático (inibe o crescimento da bactéria) e, em associação possuem um efeito bactericida (efeito letal sobre a bactéria); sendo, portanto, uma grande vantagem para sua utilização (Sköld, 2009).

A **Figura I.1.6** apresenta um relatório de produtos veterinários com licença vigente referente à sulfonamidas no Brasil (MAPA, 2012).

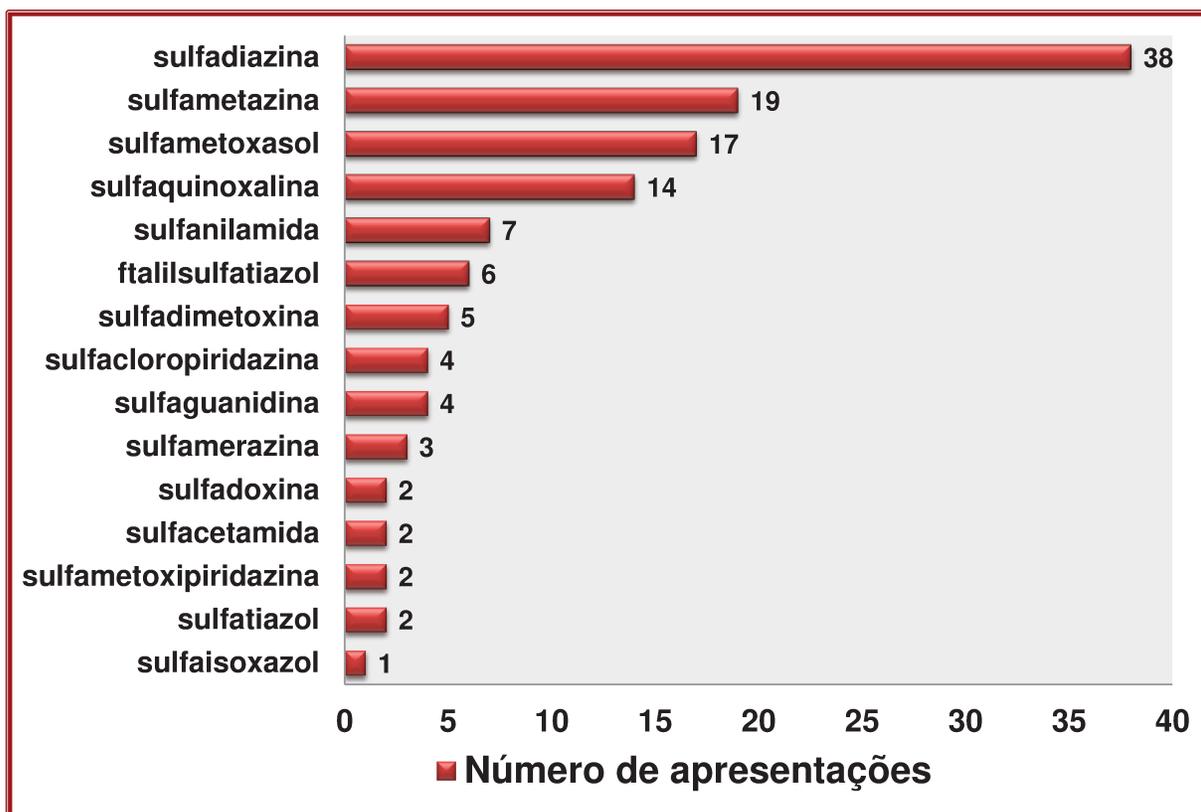


Figura I.1. 6. Produtos veterinários sulfonamídicos com licença vigente (MAPA, 2012).

A indústria farmacêutica oferece um grande número e variedade de formulações veterinárias que contém sulfonamidas e o controle de qualidade destas formulações é imprescindível. O gráfico da **Figura I.1.7** mostra a quantidade de medicamentos nas diferentes formas farmacêuticas e a quantidade de empresas que comercializam as formulações no Brasil.

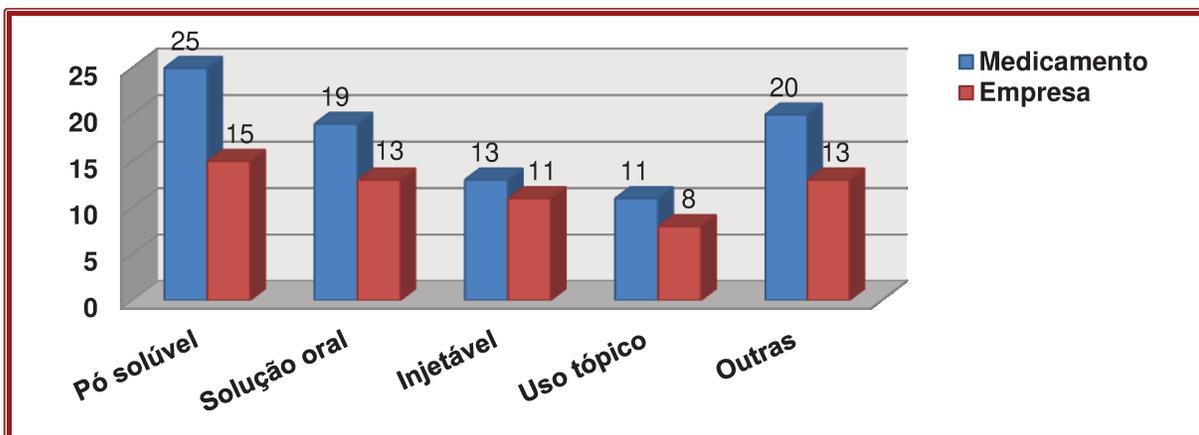


Figura I.1. 7. Números de medicamentos contendo sulfonamidas como princípio ativo comercializados no Brasil, categorizados por formas farmacêuticas e número de empresas (MAPA, 2012).

Um amplo grupo de animais é tratado com sulfonamidas (com ou sem associação), entre eles estão equinos, caprinos, animais domésticos (como cães e gatos), porém sua principal aplicação é em aves, bovinos, suínos e ovinos.

Na avicultura as sulfonamidas de maior utilização são sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfamerazina, sulfatiazol e sulfadiazina. Estes antimicrobianos tem sido usados para controle de coccidiose, pulrose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas. A via preferencial de administração de sulfonamidas e associações com diaminopirimidinas em aves é por via oral, mediante água de beber e ração (Wassenaar, 2005).

Na suinocultura as principais sulfonamidas utilizadas são a sulfametazina (ou sulfadimidina) e sulfatiazol, ambas em associações com tetraciclina e/ou penicilinas. São indicadas para o tratamento de pneumonia bacteriana, colibacilose suína, enterite bacteriana suína e redução na incidência de abscessos cervicais (Wassenaar, 2005).

Na bovinocultura a principal utilização das sulfonamidas é no tratamento de mastite (processo inflamatório da glândula mamária). O processo inflamatório envolve uma série de alterações fisiológicas que podem exercer influência sobre a farmacocinética e farmacodinâmica de medicamentos de uso intramamário utilizados

na terapêutica da mastite e, daqueles administrados por via sistêmica, para o tratamento desta e de outras afecções (Costa, 1999).

As sulfonamidas não devem ser utilizadas como aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais e no Brasil, estão vedados o uso de sulfonamidas sistêmicas (MAPA, 1998).

Os fármacos objeto do presente estudo foram selecionados junto à Coordenação de Produtos Veterinários (CPV) do MAPA. As sulfonamidas selecionadas para este trabalho fazem parte da lista de prioridades do CPV do MAPA. Assim sendo, as sulfonamidas com licença vigente (MAPA, 2012) selecionadas para quantificação foram sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina, uma vez que as outras sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina e sulfametoxazol) e trimetoprima já estavam sendo estudadas por outros membros do Grupo do Laboratório de Bioanalítica Paracelsus.

I.1.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO

A análise de fármacos veterinários de diferentes classes terapêuticas envolve o uso de uma variedade de técnicas.

A literatura revela vários métodos disponíveis para a determinação de sulfonamidas, os quais incluem a cromatografia à gás (Chivarino *et al.*, 1998), a cromatografia à líquido (El Anwar *et al.*, 1991), métodos eletroanalíticos (Msagati & Ngila, 2002), ensaios imunológicos (Martbauer *et al.*, 1994), a espectrofluorimetria (Pena *et al.*, 1992), a espectrofotometria (Raghuveer *et al.*, 1993), entre outros.

Em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010). Porém, esta ainda carece de monografias específicas para a determinação de sulfonamidas em formulações farmacêuticas e, principalmente, não contempla formulações de uso veterinário. De modo geral, os procedimentos para a determinação de sulfonamidas envolvem titulação por

diazotação, espectrofotometria no ultravioleta e visível, sendo que somente o método de doseamento da sulfadiazina sob a formulação comprimido foi substituído por cromatografia líquida de alta eficiência. Em contrapartida, mais da metade dos métodos empregados pela Farmacopeia Americana, (USP, 2007) na determinação de sulfonamidas são cromatográficos. A Farmacopeia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009) recomenda o uso de métodos espectrofotométricos e titulações para a determinação de sulfonamidas em formulações farmacêuticas.

O controle de qualidade de fármacos veterinários é particularmente importante, uma vez que podem permanecer resíduos dos medicamentos veterinários nos animais tratados e destinados ao consumo humano, caso não sejam observadas as boas práticas veterinárias, seja em função do uso exagerado e/ou indevido, ou mesmo do não cumprimento dos períodos de carência (FAO/WHO, 1993). A má qualidade dos medicamentos não só afeta o plantel de animais; como também é um tópico relevante quanto à segurança alimentar.

I.1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método é um processo contínuo que inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do seu desenvolvimento. A maioria dos órgãos reguladores do Brasil e de outros países exige a validação de metodologia analítica e, para isso, tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. No entanto, de modo geral, os protocolos não são harmonizados.

No intuito de padronizar estes procedimentos, a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC (Thompson *et al.*, 2002) publicou um guia para validação de métodos analíticos que tem sido utilizado pela Organização

Internacional de Padronização – ISO (Thompson *et al.*, 2002). Em 1990, as agências regulatórias dos Estados Unidos (FDA), Japão (MHLW) e União Europeia (EMA) passaram a organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), para estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Neste contexto, o ICH (ICH, 2005) elaborou um guia sobre validação de métodos que tem sido utilizado também em outras áreas de estudo além da farmacêutica. Na área de Química Ambiental, os métodos padronizados para análise de contaminantes publicados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, 2007) contêm orientações a respeito da validação destes métodos.

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos para determinação de fármacos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de junho/2007 (INMETRO, 2007).

Apesar da existência dos guias da ANVISA e do INMETRO, recentemente o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011^o) publicou o Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica. Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários.

1.1.4.1. Parâmetros analíticos para validação de métodos

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traço (Ribani *et al.*, 2004).

Os parâmetros analíticos de validação são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das metodologias, e são normalmente encontrados

na literatura como: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão (repetitividade e reprodutibilidade interna), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

A estimativa destes parâmetros pode variar de acordo com a técnica analítica empregada ou com o protocolo de validação a ser seguido. As definições e critérios destes parâmetros podem variar entre os protocolos, porém os parâmetros de validação descritos acima integram basicamente todos eles.

A validação dos métodos propostos neste trabalho foi realizada com base na Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), guia disponível no momento da execução do trabalho. No entanto, os resultados, sempre que possível, também foram avaliados pelo Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica - Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, publicado pelo MAPA em 2011.

Os testes a serem realizados para a validação de métodos para análise de produtos farmacêuticos são classificados em quatro categorias de acordo com a sua finalidade, conforme é apresentado na **Tabela I.1.2**.

Tabela I.1. 2. Classificação dos testes segundo sua finalidade (ANVISA, 2003; MAPA, 2011^o).

Categoria	Finalidade do teste (ANVISA, 2003)	Finalidade do teste (MAPA, 2011^o)
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.	Testes quali-quantitativos para a determinação do princípio ativo em medicamentos veterinários, matérias-primas, produtos para alimentação animal e matrizes de origem biológicas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.	Testes quali-quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos veterinários e matérias-primas e ensaios limite.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).	Testes de desempenho (por exemplo: dureza, friabilidade, viscosidade).
IV	Testes de identificação.	Testes de identificação para ingrediente ativo (por exemplo: identificação de substância por espectroscopia no infravermelho).
V	-	Testes quali-quantitativos para determinação de traços de fármacos em ração (contaminação cruzada).

Para cada categoria na **Tabela I.1.3** estão indicados os parâmetros mínimos de desempenho que devem ser avaliados durante a validação do método analítico proposto.

Tabela I.1. 3. Ensaios que devem ser estudados na validação do método analítico, de acordo com sua finalidade e categoria (ANVISA, 2003; MAPA, 2011^o).

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	Categoria V [#]
		Quantitativo	Ensaio limite			
Especificidade/ seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	Sim
Faixa linear	Sim	Sim	*	*	Não	Sim
Precisão	Intra-ensaio	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	Inter-ensaio	**	**	Não	**	
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não	Sim
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não	Sim
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão inter-ensaio. Parâmetro específico da Resolução da ANVISA (2003).

Categoria incluída no Guia de Validação do MAPA (2011^o).

A seguir são apresentados e discutidos os principais parâmetros de validação de métodos cromatográficos e suas definições, aplicados a **Categoria I**, de acordo com a Resolução da ANVISA (2003) e do Guia do MAPA (2011^o).

1.1.4.1.1. Efeito matriz e seletividade

Apesar da relevância, nem todos os protocolos de validação de métodos discorrem sobre experimentos para avaliação dos efeitos de matriz. A ANVISA (2003) não menciona este parâmetro para análise de fármacos. Porém, o Guia de Validação do MAPA (2011^o) articula que é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do

sinal analítico. Os estudos referentes ao efeito matriz são delineados com o preparo de curvas analíticas no solvente e curvas analíticas na matriz.

Caso não haja disponíveis amostras brancas para a obtenção do extrato da matriz branca, o método adição de padrão deverá ser utilizado para a determinação da concentração do analito. Os resultados obtidos pela análise do analito por curva no solvente e por adição de padrão deverão ser estatisticamente analisados, aplicando o teste F , de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas estatisticamente iguais. Sendo as variâncias das amostras estatisticamente equivalentes, os desvios-padrão desses dois grupos de análise podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras deverá ser testada com a distribuição t de Student. Dessa forma, para aceitação da não existência de efeito matriz as médias dos dois conjuntos de amostras analisadas deverão ser estatisticamente iguais.

Segundo a ANVISA (2003) e o Guia de Validação do MAPA (2011^o), a seletividade é a capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra. É um parâmetro que deve ser demonstrado e que depende do método analítico empregado. Para determinar a seletividade de um método os componentes da matriz, produtos de degradação e impurezas devem ser avaliados com a finalidade de verificar a interferência ou não destes com o sinal analítico.

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada para garantir que o sinal analítico seja proveniente exclusivamente do analito e não de outros compostos presentes na amostra. A seletividade pode ser então, avaliada por meio da comparação entre cromatogramas de extratos branco da matriz e extratos branco da matriz fortificada com o analito. Este parâmetro pode ser avaliado também pela análise da pureza de pico que é verificada em três pontos (início, ápice e fim do pico) quando são empregados métodos como a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos. Além disso, os espectros de UV obtidos nestes três pontos do pico devem ser comparados com o espectro do padrão do analito.

I.1.4.1.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade

Segundo a ANVISA (2003), a curva analítica representa a relação entre a resposta analítica e a concentração conhecida do analito. A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser mantida constante. O teor do analito deve estar contido no intervalo de linearidade de 80 a 120% da concentração teórica do teste (teor do princípio ativo no medicamento).

Ainda, a ANVISA (2003) preconiza que a linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro da faixa linear da curva analítica. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Para expressar a linearidade do método é empregado o coeficiente de correlação (r) da curva analítica. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é $r > 0,99$.

O Guia de Validação do MAPA (2011^o) não recomenda um intervalo para a faixa linear, apenas recomenda que a concentração esperada para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva analítica.

Em adição o Guia de Validação do MAPA faz referência a um tratamento estatístico mais detalhado e rigoroso do que a Resolução da ANVISA. Para avaliação da linearidade do método devem ser aplicadas três etapas estatísticas: 1) projeto experimental que consiste na determinação da faixa de interesse considerando que a concentração do analito na amostra deva estar próxima ao centro do intervalo da faixa; 2) o método dos mínimos quadrados ordinários incluindo a estimativa dos parâmetros e tratamento de valores extremos (*outliers*) (avaliado pelo teste de Jackknife); 3) verificação das suposições relacionadas ao método dos mínimos quadrados ordinários e resíduos (no teste para hipótese residuais é utilizado a homocedasticidade) (Souza & Junqueira, 2005; MAPA, 2011^o).

Os *outliers* devem ser avaliados pelo teste residual de Jackknife (J_{ei}) como descrito pela **Equação I.1.1**.

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}}$$

Equação I.1.1

onde, p é o número de parâmetros do modelo, $r_i = \frac{e_i}{S_{ei}}$ o resíduo padronizado, $S_{ei} = s_{res} \sqrt{1 - h_i}$ o erro padrão do resíduo e $h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$ é o ponto de alavanca.

Este teste usa uma estimativa do desvio padrão de pontos independentes. Assim, os resíduos são facilmente calculados para cada ponto sem ter que adequar n regressões separadas, excluindo cada um dos pontos. Os resíduos de Jackknife são distribuídos como a distribuição t em $n-p-1$ graus de liberdade. Valor de J_{ei} maior do que o valor t crítico é considerado outlier. Para cada dado eliminado, o método dos mínimos quadrados ordinários deverá ser realizado novamente.

Caso os dados não sejam normalmente distribuídos ou não são homocedásticos, uma transformação na variável, assim como raiz quadrada, logaritmo ou outras deverá ser testada. Se a variável transformada for normalmente distribuída e homocedástica ela poderá então ser utilizada nas análises.

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados assume que cada ponto de dados na faixa tem uma variação absoluta constante (homocedasticidade). O teste de Levene pode ser utilizado para avaliar a homocedasticidade confrontando a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si (há homocedasticidade). A hipótese nula é rejeitada quando a estatística t_L calculada for maior que o t crítico ($t_{(1-\alpha/2; n1+n2-2)}$, sendo $\alpha = 0,05$; 95% de confiança).

No teste de Levene, os resíduos são divididos em dois grupos de tamanho n_1 e n_2 , sempre que possível equilibrando a distribuição dos pontos entre os grupos em função dos níveis de concentração x_i estudados, sem separar as replicatas de um mesmo nível em grupos diferentes. As medianas dos resíduos de cada grupo \tilde{e}_1 e \tilde{e}_2 são calculadas. Os valores absolutos das diferenças entre os resíduos e as medianas dos respectivos grupos $d_{i1} = |\tilde{e}_1 - e_{i1}|$ e $d_{i2} = |\tilde{e}_2 - e_{i2}|$ são obtidos. A média das diferenças (\bar{d}_j) e a soma dos quadrados dos desvios (SSD_j) dos valores d_{ij}

de cada grupo $j = 1$ e $j = 2$ são calculados. A estatística de Levene (t_L) é avaliada pela **Equação I.1.2**.

$$t_L = \frac{\bar{d}_1 - \bar{d}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}} \quad \text{Equação I.1.2}$$

onde, t_L é a estatística t de Levene, $\bar{d}_j = \sum |\tilde{e}_j - e_{ij}|/n_j$ é a média dos módulos das diferenças entre cada resíduo e a mediana de cada grupo $j = 1$ e $j = 2$, n_j o número de observações em cada grupo, \tilde{e}_j é a mediana de cada grupo, $s_p^2 = \frac{SSD_1 - SSD_2}{n_1 + n_2 - 2}$ são as variâncias combinadas, SSD_j é a soma dos quadrados dos desvios de d_{ij} para cada grupo e $d_i = |\tilde{e}_j - e_{ij}|$ é o módulo da diferença entre cada resíduo e o grupo de mediana.

Quando o teste estatístico (t_L) não excede o valor crítico de $t(1-\alpha/2)$ para n_1+n_2-2 graus de liberdade, há indicação de homocedasticidade, não havendo razão para rejeitar a hipótese nula e acreditar que a variância dos resíduos não seja constante.

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta varia em função da variação da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

I.1.4.1.5. Precisão

Segundo a ANVISA (2003) e MAPA (2011^c), a precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre as várias medidas efetuadas na mesma amostra. A precisão pode ser estimada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-ensaio), precisão intermediária (precisão inter-ensaio) e reprodutibilidade. Para a validação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque neste trabalho, apenas os dois primeiros níveis são relevantes para este parâmetro.

De acordo com a ANVISA (2003), a precisão intra-ensaio descreve as variações observadas durante análises em um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade é verificada por no mínimo seis determinações a 100% da concentração do teste. E a precisão inter-ensaio descreve o grau de variações observadas em diferentes condições (mínimo de dois dias diferentes). O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

Conforme o Guia de Validação do MAPA (2011^o) para se determinar a precisão intra-ensaio (descrita neste Guia como repetitividade) deverá ser usado o método de adição de padrão, caso não se disponha de amostras brancas. Assim, a curva de adição de padrão deverá ter no mínimo cinco níveis de concentração e ser realizada, em pelo menos, seis réplicas independentes. A precisão inter-ensaio (descrita neste Guia como precisão intermediária, reprodutibilidade interna ou intralaboratorial) é realizada da mesma maneira que a precisão intra-ensaio em pelo menos mais duas vezes em dias diferentes. O valor máximo admitido varia de acordo com a concentração do analito e leva em consideração a Equação de Horwitz (MAPA, 2011^o).

Usualmente, a precisão é expressa como a estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conforme **Equação I.1.3**.

$$RSD (\%) = \frac{s}{Média} \times 100 \qquad \text{Equação I.1.3}$$

I.1.4.1.6. Exatidão

A ANVISA (2003) estabelece que a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais e um valor aceito como referência. Pode ser calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionada à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida do intervalo de confiança. A exatidão deverá ser

verificada em três níveis de concentração, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata. É expressa de acordo com a **Equação I.1.4**.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação I.1.4}$$

O Guia de Validação do MAPA (2011^o) retrata exatidão como veracidade/recuperação. A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade. Dessa forma, a determinação da veracidade deve ser feita por ensaios de recuperação utilizando material de referência certificado. Caso não haja esse material, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. No entanto, este Guia não relata outros procedimentos alternativos caso não haja nem o material de referência certificado e nem a matriz branca.

A faixa de aceitação da veracidade/recuperação varia de acordo com a concentração do analito e leva em consideração a Equação de Horwitz (MAPA, 2011^o).

I.1.4.1.7. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, portanto é uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar, sem perder a confiabilidade, e sua estimativa depende do tipo de metodologia analítica utilizada. Ao ser constatado a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003; MAPA, 2011^o).

A ANVISA (2003) indica uma lista de parâmetros a serem avaliados nos testes de robustez de metodologias analíticas para as técnicas de preparo de amostras, espectrofotometria, cromatografia à líquido e cromatografia à gás. No entanto, nenhuma menção é dada referente a testes estatísticos para avaliar os resultados.

O INMETRO (2007) recomenda o teste de Youden para determinar a robustez de um método. Este teste emprega um planejamento fatorial fracionário. Neste teste é possível realizar oito combinações de sete fatores variáveis.

O Guia de Validação do MAPA (2011^o) relata que a robustez deve ser realizada para demonstrar a estabilidade do procedimento sob diferentes condições (tempo, temperatura, pH, entre outras), diferentes fabricantes de insumos, colunas cromatográficas, entre outras variações. O teste de robustez deve ser realizado utilizando a abordagem clássica variando um fator de cada vez, ou utilizando a abordagem do planejamento fatorial completo ou fracionário (teste de Youden).

I.2. OBJETIVOS

Neste capítulo, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de métodos para a separação de seis sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina) e trimetoprima e a validação do método para a determinação de sulfadiazina, sulfadimetoxina, e sulfaquinoxalina em fármacos de uso veterinário, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

I.3. PARTE EXPERIMENTAL

I.3.1. Reagentes, Solventes e Padrões

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau de pureza analítica, os solventes orgânicos de grau HPLC e as soluções foram preparadas em água deionizada e purificada obtida de um sistema Milli-Q – 18,2 M Ω cm (Millipore, EUA). As soluções e solventes foram filtrados em filtros de membrana de 0,45 μ m, acoplados a sistema de filtração (Millipore, EUA).

Os padrões analíticos das sulfonamidas foram: sulfadiazina – SDZ (Sigma-Aldrich, 99%), sulfatiazol – STZ (Sigma-Aldrich, 99%), sulfametazina – SMZ (Sigma-Aldrich, 99%), sulfametoxazol – SMX (Sigma-Aldrich, 99%), sulfadimetoxina sódica – SDM (Sigma-Aldrich, 99%); sulfaquinoxalina sódica – SQX (Sigma-Aldrich, 95%); e trimetoprima – TMTP (Fluka, 99%).

A **Figura I.3.1** apresenta as estruturas dos antimicrobianos sulfonamidas e trimetoprima estudados neste trabalho.

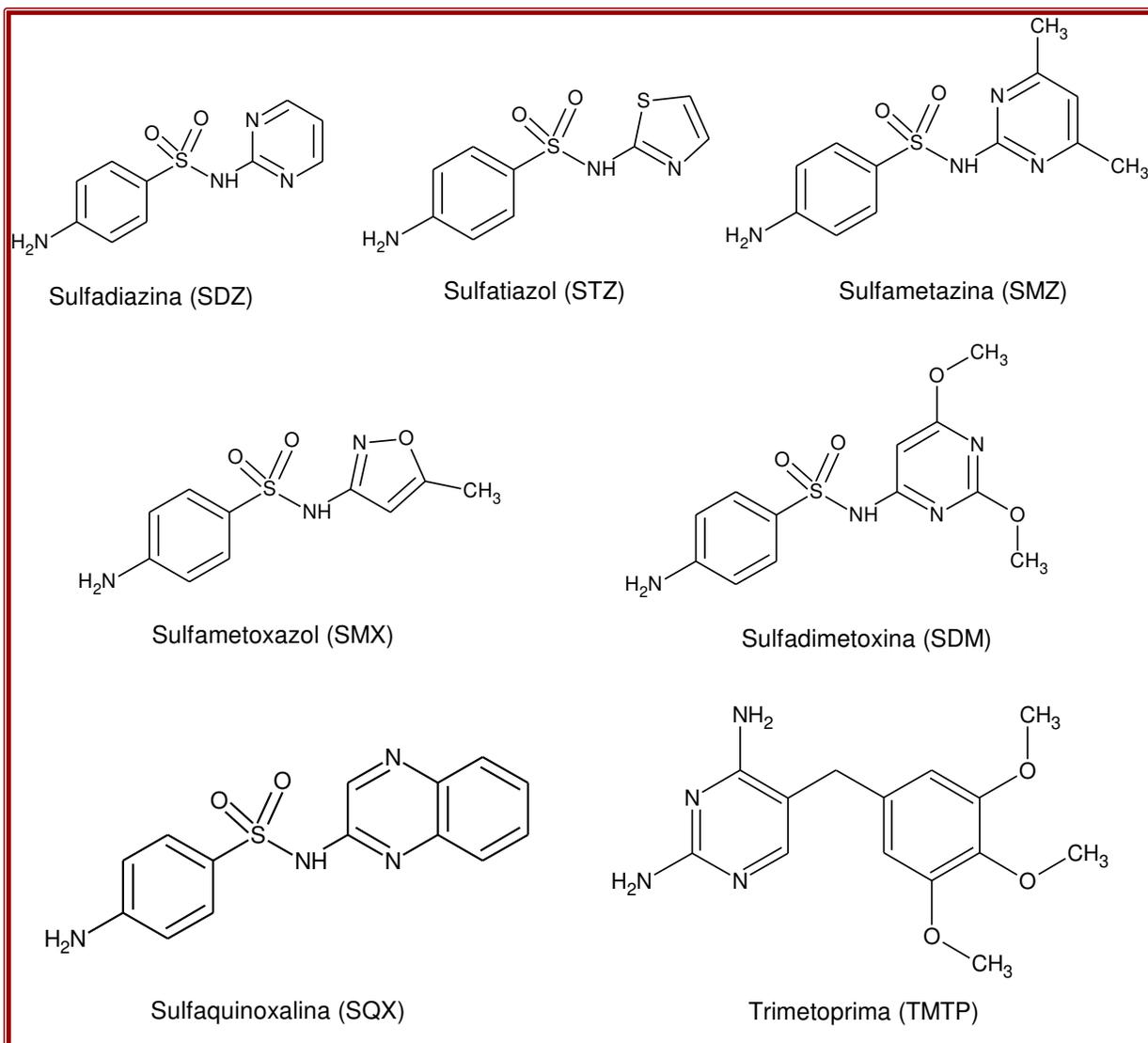


Figura I.3. 1. Estrutura molecular das sulfonamidas e trimetoprima.

I.3.2. Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência série 1200 (Agilent, EUA), equipado com sistema de bombeamento quaternário modelo G1311A, detector de arranjo de fotodiodos – DAD – modelo G1315D, forno para coluna modelo G1316A e injetor

automático modelo G1329A. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa computacional ChemStation (Agilent, EUA).

Para a desgaseificação da fase móvel foi utilizado um banho de ultra-som modelo USC 700 (UNIQUE THORTON, Brasil).

Os padrões analíticos foram pesados em uma balança analítica Sartorius modelo CPA 225D (Alemanha), com precisão de $\pm 0,01$ mg.

As amostras de medicamentos veterinários sob a formulação de pó solúvel foram pesadas em balança analítica Precisa modelo XT 220A (Suíça), com precisão de $\pm 0,1$ mg.

I.3.3. Materiais

I.3.3.1 Colunas cromatográficas

Para os estudos de separação cromatográfica foi empregada uma coluna XBridge™ (Waters, EUA) de fase reversa de sílica híbrida (segunda geração, C₁₈) com dimensões 150 x 4,6 mm e diâmetro de partícula de 3,5 μ m com sua respectiva coluna de guarda (XBridge™ 20 mm x 4,6 mm; 3,5 μ m).

I.3.3.2 Amostras

As amostras de medicamentos veterinários foram adquiridas no comércio da região de Campinas, SP, nos anos de 2010 a 2012. No total, foram adquiridas 17 amostras de 10 fabricantes diferentes. A **Tabela I.3.1** apresenta as amostras analisadas, bem como o tipo de formulação e outros fármacos associados.

Tabela I.3. 1. Informações básicas sobre as amostras de medicamentos veterinários analisadas no presente trabalho.

Amostras	Formulação	Princípio ativo principal	Compostos em Associação	Empresa Farmacêutica
1-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	A
2-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	A
3-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	F
4-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	A
5-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	G
6-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	J
7-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	J
8-SDZ	Injetável	Sulfadiazina	Trimetoprima	E
1-SDM	Injetável	Sulfadimetoxina	Trimetoprima	B
1-SQX	Pó Solúvel	Sulfaquinoxalina	-	D
2-SQX	Pó Solúvel	Sulfaquinoxalina	-	E
3-SQX	Pó Solúvel	Sulfaquinoxalina	Sulfametazina e bacitracina de zinco	C
4-SQX	Sol. Oral	Sulfaquinoxalina	Sulfametazina	H
5-SQX	Sol. Oral	Sulfaquinoxalina	Sulfametazina	H
6-SQX	Pó Solúvel	Sulfaquinoxalina	-	I
7-SQX	Pó Solúvel	Sulfaquinoxalina	Diaveridina	G
8-SQX	Pó Solúvel	Sulfaquinoxalina	Diaveridina	G

SDZ: sulfadiazina; SDM: sulfadimetoxina e SQX: sulfaquinoxalina.

I.3.4. Metodologia

I.3.4.1. Preparo de soluções

Todas as soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas à concentração de 1,0 mg mL⁻¹, separadamente, em metanol e mantidas sob

refrigeração (4 °C) e ao abrigo de luz para os ensaios com os fármacos veterinários por um período de até três meses.

As soluções de trabalho das sulfonamidas foram preparadas diariamente mediante diluição das soluções estoque em fase móvel na proporção 20:80 (v/v) (metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: 0,1% (v/v) ácido fórmico) e mantidas ao abrigo de luz.

A solução orgânica da fase móvel foi preparada pela adição de 1 mL de ácido fórmico em um balão volumétrico de 1 L e completado com metanol; enquanto, a solução aquosa foi preparada pela adição de 1 mL de ácido fórmico em um balão volumétrico e completado com água. A proporção 20:80 (v/v) foi preparada pela mistura da fase orgânica (20 mL medidos em proveta) com a fase aquosa (80 mL medidos em proveta).

1.3.4.2. Preparo de amostra

As amostras de medicamento veterinário nomeadas de 1 a 5-SDZ e 8-SDZ (injetável) foram preparadas pela adição de uma alíquota de 1 mL da amostra em um balão volumétrico de 100 mL e completado com uma solução contendo 50:50 (v/v) de MeOH:H₂O. Desta solução, uma nova diluição foi realizada na proporção 1:20 em fase móvel (20:80 (v/v); metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico). As amostras 1, 2 e 3-SDZ foram diluídas, a partir da solução anterior, na proporção 1:10 em fase móvel (20:80 (v/v); metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foram analisadas por padronização externa. As amostras 4, 5 e 8-SDZ também foram diluídas na proporção 0,75:10 em fase móvel (20:80 (v/v); metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foram analisadas por adição de padrão.

As amostras 6 e 7-SDZ (injetável) foram preparadas pela diluição de 1:100 em água. Desta solução uma nova diluição na proporção 3:20 em fase móvel (20:80 (v/v); metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido

fórmico) foi realizada. A solução intermediária da amostra foi então diluída na proporção 1:10 em fase móvel (20:80 (v/v); metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foi analisada por adição de padrão.

A amostra 1-SDM (injetável) foi preparada pela adição de uma alíquota de 1 mL da amostra para um balão volumétrico de 100 mL e completado com água. Desta solução foi realizada uma nova diluição na proporção de 1:100 em fase móvel (20:80 (v/v); metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foi analisada por padronização externa.

As amostras nomeadas de 1, 2 e 6-SQX (pó solúvel) foram preparadas pesando uma quantidade de aproximadamente 0,4 g de amostra (equivalente a 0,1 g de SQX) e dissolvendo em 10 mL de água com ajuda de banho ultra-sônico por 3 minutos. A partir desta solução, foi realizada uma nova diluição na proporção de 0,1:10 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico). A solução intermediária das amostras 1, 2-SQX foram ainda diluídas na proporção 1:10 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foram analisadas por padronização externa. A solução intermediária da amostra 6-SQX foi diluída na proporção de 0,75:10 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foi analisada por adição de padrão.

A amostra 3-SQX (pó solúvel) foi preparada pesando uma quantidade de aproximadamente 2 g de amostra (equivalente a 0,1 g de SQX) e dissolvendo em 10 mL de água com ajuda de banho ultra-sônico por 3 minutos. Desta solução, foi realizada uma nova diluição na proporção de 0,1:10 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico). Esta solução intermediária foi então diluída na proporção 1:10 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foi analisada por padronização externa.

As amostras 4 e 5-SQX (solução oral) foram preparadas pela adição de uma alíquota de 1 mL da amostra para um balão volumétrico de 100 mL e completado

com água. Desta solução foi realizada uma nova diluição na proporção 0,5:10 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico), uma vez que foi analisada por padronização externa.

As amostras 7 e 8-SQX (pó solúvel) foram preparadas pesando uma quantidade de aproximadamente 0,7 g de amostra (equivalente a 0,1 g de SQX) e dissolvendo em uma solução de 10 mL contendo 50:50 (v/v) MeOH:H₂O com ajuda de banho ultra-sônico por 3 minutos. Desta solução foi realizada uma nova diluição na proporção 1:5 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico). A partir desta solução intermediária, uma nova diluição de 0,75:10 em fase móvel (20:80 (v/v), metanol acrescido de 0,1% (v/v) ácido fórmico: solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico) foi realizada, uma vez que foi analisada por adição de padrão.

Todas as amostras foram filtradas com filtros de seringa de 0,22 µm (MillexTM, Millipore, Brasil) antes das análises cromatográficas.

1.3.4.3. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfonamidas em fármacos de uso veterinário

1.3.4.3.1. Desenvolvimento do método cromatográfico e parâmetros de conformidade do sistema

A separação cromatográfica das sulfonamidas SDZ, STZ, SMZ, SMX, SDM e SQX, além da TMTP foi otimizada usando a cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detector de arranjos de diodos (HPLC-DAD). Foi usada uma fase estacionária de fase reversa (C₁₈) de composição sílica híbrida (XBridgeTM 150 mm x 4,6 mm; 3,5 µm) com sua respectiva coluna de guarda (XBridgeTM 20 mm x 4,6 mm; 3,5 µm).

A fase móvel utilizada para os estudos da separação das sulfonamidas foi o emprego de metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico como fase orgânica (FO) e uma solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico como fase aquosa (FA). Para a detecção das sulfonamidas, o detector DAD permitiu a seleção dos comprimentos de onda de máxima absorbância para cada uma das sulfonamidas e trimetoprima analisadas.

O modo de eluição foi por gradiente e várias proporções de FO e FA foram avaliadas para promover uma separação adequada das seis sulfonamidas e trimetoprima.

Para estabelecer a conformidade do sistema cromatográfico (*System Suitability*) os seguintes parâmetros foram avaliados: resolução (R_s), número de pratos (N), fator de assimetria (A_s), fator de alargamento (TF: *tailling factor*) e fator de retenção (k). A otimização do método para a quantificação das sulfonamidas visou os parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Americana (USP, 2007) com seus respectivos critérios de aceitação. Na ausência de alguns parâmetros pela farmacopéia foram estabelecidos como critério de aceitação os seguintes valores: $R_s > 2$, $N > 2000$, $0,9 < A_s < 1,2$ e $k > 2$ (Shabir, 2003).

1.3.4.3.2 Estudo da estabilidade das sulfonamidas: sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX)

Para os estudos de estabilidade, soluções estoque de SDZ, SDM e SQX na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas em metanol e armazenadas conforme descrito na **Tabela I.3.2**. As soluções de trabalho (SDZ – $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, SDM – $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e SQX – $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em fase móvel na proporção 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa a partir da solução estoque preparada no mesmo dia e armazenada como descrito na **Tabela I.3.2**. Dado o período de análise das soluções, a solução estoque de cada sulfonamida foi previamente diluída em fase móvel na proporção 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa nas concentrações de trabalho correspondentes.

Tabela I.3. 2. Condições de estocagem para o estudo de estabilidade dos fármacos em solução.

Temperatura	Frasco	Sigla	Tempo (Semanas)						
Solução estoque de SDZ, SDM e SQX									
Ambiente (25 °C)	Âmbar	AA	0	1	2	3	4	8	12
Ambiente (25 °C)	Transparente	AT	0	1	2	3	4	8	12
4 °C	Transparente	G	0	1	2	3	4	8	12
Solução de Trabalho de SDZ, SDM e SQX									
Ambiente (25 °C)	Âmbar	AA	0	1	2	3	4	8	12

1.3.4.3.3. Parâmetros de validação

A seletividade do método foi avaliada mediante o estudo de degradação dos fármacos, bem como a análise da pureza dos picos. A degradação dos fármacos foi realizada submetendo-os a condições de estresse.

As soluções intermediárias de cada fármaco ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas nos seguintes meios: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ácido clorídrico, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ hidróxido de sódio, 3% (v/v) peróxido de hidrogênio e em banho-maria na temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

As soluções das sulfonamidas preparadas nestes meios foram analisadas uma hora e 24 horas após seu preparo. Antes de realizar a análise, a solução intermediária da SDZ foi diluída para $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as soluções da SDM e SQX foram diluídas para $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, todas em fase móvel. A degradação foi avaliada por comparação dos cromatogramas das sulfonamidas nestes meios com soluções padrão recém preparadas. Além disso, a seletividade também foi avaliada pela pureza do pico e esta foi analisada em três pontos (início, meio e final do pico). Os ensaios de degradação foram realizados em triplicata.

Para avaliar a linearidade do método foi construída uma curva analítica de trabalho usando cinco níveis de concentração das sulfonamidas, individualmente, seguindo o intervalo de 50 a 150% em relação ao princípio ativo na amostra. A

equação da reta da curva analítica foi obtida pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Também foram avaliados os resíduos, os valores extremos, o coeficiente de regressão linear (r , linearidade) e a homocedasticidade. A sensibilidade do método foi obtida pelo coeficiente angular da curva analítica.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise em um mesmo dia, com mesmo equipamento e analista, uma mesma amostra de medicamento em sextuplicata em um nível de concentração correspondente a 100% do valor médio da curva analítica. A precisão inter-ensaio foi avaliada para a mesma amostra em três dias diferentes (seis vezes no primeiro dia e três vezes em outros dois dias, ou seja, $n = 12$). A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A exatidão do método foi avaliada mediante ensaios de recuperação. Para tanto, amostras de medicamentos foram fortificados em três níveis de concentração (baixo, médio e alto). Para o nível de fortificação mais baixo (40%), foram preparadas soluções contendo concentrações conhecidas do padrão ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e concentrações da amostra de medicamento equivalentes a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (calculado em base ao valor nominal), totalizando uma concentração aproximada de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ que é equivalente à concentração média da curva analítica. O nível de fortificação médio (50%) foi realizado preparando soluções contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do padrão e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ da amostra de medicamento. Para o nível de fortificação alto (60%) foram preparadas soluções contendo $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ do padrão e $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ da amostra de medicamento. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A recuperação das sulfonamidas foi calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão acrescido à amostra.

Um método é dito robusto quando se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando o mesmo está sendo executado. O teste de robustez para as sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) foi realizado de acordo com a abordagem de Youden (INMETRO, 2007; MAPA, 2011^o) a qual é um planejamento fatorial fracionário. Neste planejamento é possível realizar oito combinações de sete fatores variáveis, o que significa explorar os efeitos dos sete parâmetros com apenas oito resultados analíticos.

Geralmente, os fatores são variados em dois níveis, porém, a escolha deste intervalo entre níveis extremos não tem sido sistematicamente abordada na literatura. Assim, a escolha deste intervalo neste trabalho foi determinada pelos autores uma vez que nenhum dos guias faz sugestões sobre este item.

A robustez foi avaliada mediante a variação de 7 fatores e 8 experimentos conforme apresentado na **Tabela I.3.3**. A concentração de SDZ utilizada para a realização do ensaio foi $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para SDM e SQX foi de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória, através de sorteio, e em duplicata ($n = 2$).

Os fatores avaliados no ensaio de robustez foram: concentração de ácido fórmico (A), vazão da fase móvel (B), proporção do volume da fase móvel (C), fabricante de metanol (D), temperatura da coluna (F), comprimento de onda (G). Todos estes fatores foram avaliados para as três sulfonamidas.

O fator representado por (E) variou conforme a sulfonamida estudada. Sendo para a SDZ (solubilização da amostra), para a SDM (coluna cromatográfica) e para a SQX (tempo de solubilização da amostra em banho ultra-sônico).

Tabela I.3. 3. Fatores com suas respectivas variáveis que foram considerados na determinação da robustez do método desenvolvido para SDZ, SDM e SQX bem como os seus 8 experimentos.

Fatores	Experimentos							
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
A	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	-	-	+	+	-	-
C	+	-	+	-	+	-	+	-
D	+	+	-	-	-	-	+	+
E	+	-	+	-	-	+	-	+
F	+	-	-	+	+	-	-	+
G	+	-	-	+	-	+	+	-

Experimentos (+) correspondem aos valores nominais e (-) aos valores que foram variados.

Os efeitos dos fatores foram estimados de acordo com a **Equação I.3.1**.

$$E_X = \frac{\Sigma Y_{(+)} - \Sigma Y_{(-)}}{N/2} \quad \text{Equação I.3.1}$$

onde, $\Sigma Y_{(+)}$ e $\Sigma Y_{(-)}$ representam as somas das respostas em que o fator X é do nível (+) e (-), respectivamente; e N é o número de experimentos realizados.

1.3.4.4. Análise de medicamentos veterinários contendo sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina como principais ativos por HPLC-DAD

As amostras descritas no item 1.3.3.2 foram quantificadas mediante padronização externa ou adição de padrão.

A) Padronização externa

As amostras 1 a 4-SDZ, 1-SDM e 1 a 5-SQX foram quantificadas mediante padronização externa uma vez que não apresentaram efeito matriz. Dessa forma, todas as amostras foram preparadas (conforme descrito no item 1.3.4.2) de forma que a concentração esperada para as amostras se situasse em torno do ponto médio da curva analítica ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$).

B) Adição de padrão

As amostras 5 a 8-SDZ e 6 a 8-SQX foram quantificadas mediante adição de padrão uma vez que ensaios de recuperação demonstraram efeito matriz (recuperação inferior a 95% ou superior a 105%).

Para o método de adição de padrão as amostras de medicamento foram previamente diluídas (conforme descrito no item 1.3.4.2) a uma concentração aproximada de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ (em base as informações do fabricante) e a esta concentração foram adicionadas concentrações conhecidas do padrão (0; 2,5; 5,0; 7,5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). A adição de padrão foi analisada em 5 níveis e em triplicata independentes. O primeiro ponto da adição de padrão corresponde à amostra a ser analisada sem adição do padrão das sulfonamidas em estudo.

I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.4.1. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfonamidas em fármacos de uso veterinário

O método foi desenvolvido para a separação de seis sulfonamidas (SDZ, STZ, SMZ, SMX, SDM e SQX) e trimetoprima uma vez que nas diferentes formulações existentes ocorrem associações com outras sulfonamidas, trimetoprima e/ou outros antimicrobianos. Porém, este trabalho focou na análise de apenas três sulfonamidas, sendo elas a SDZ, SDM e SQX empregadas no tratamento e/ou profilaxia de aves, bovinos, ovinos e suínos. Apenas as três sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) foram selecionadas para quantificação devido as outras já estarem sendo analisadas por membros do Grupo do Laboratório de Bioanalítica Paracelsus.

I.4.1.1. Otimização do método e parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico

A separação cromatográfica das sulfonamidas foi avaliada com diferentes fases estacionárias. O estudo de diferentes colunas cromatográficas foi realizado previamente no Laboratório de Bioanalítica Paracelsus (Ribeiro, C.C., 2011). Foram avaliadas quatro colunas cromatográficas: 1) XBridge™ C₁₈ (150 x 4,6 mm, 3,5 μm), Waters, EUA; 2) Purospher® Star RP-18 endcapped C₁₈ (55 x 4,0 mm, 3,0 μm), Merck, Alemanha; 3) Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5,0 μm), Agilent, EUA; 4) Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5,0 μm), Agilent, EUA.

Todas as colunas avaliadas permitiram a separação das sulfonamidas, porém, o critério para a seleção da coluna cromatográfica para a separação das sulfonamidas foi baseado no parâmetro assimetria do pico. Devido à presença de

silanóis residuais na superfície da sílica modificada pode haver interações secundárias das sulfonamidas anfotéricas com estes silanóis residuais levando a uma assimetria dos picos. Essas interações podem ser minimizadas pelo uso de colunas cromatográficas capeadas.

Entre as colunas avaliadas, a coluna XBridge™ foi selecionada para o desenvolvimento do método cromatográfico, uma vez que todos os picos cromatográficos das sulfonamidas apresentaram assimetria aceitável.

Na literatura (de la Cruz *et al.*, 2011; Kurwadkar *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007; Baran *et al.*, 2006), a grande maioria dos métodos cromatográficos utilizando colunas cromatográficas de fase reversa para a determinação de sulfonamidas faz uso de fase móvel como acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH) como modificador orgânico e como fase aquosa soluções de ácido fórmico, ácido acético glacial ou acetato de amônio/ácido acético.

As condições ótimas estabelecidas para a separação e quantificação das sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) pelo método HPLC-DAD, usando como critério os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico, foram: A) fase estacionária de modo reverso (C₁₈) de composição sílica híbrida (XBridge™ 150 mm x 4,6 mm; 3,5 µm) com sua respectiva coluna de guarda (XBridge™ 20 mm x 4,6 mm; 3,5 µm); B) fase móvel: metanol contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico como fase orgânica e uma solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico como fase aquosa. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹; C) volume de injeção de 20 µL; D) temperatura da coluna foi mantida a 40 °C; E) detecção e quantificação no comprimento de onda de máxima absorção de cada sulfonamida (SDZ, 266 nm; SDM, 268 nm; e SQX, 248 nm).

O modo de eluição foi por gradiente, sendo a proporção inicial de 10% (v/v) de fase orgânica e 90% de fase aquosa, mudando para 38% (v/v) de fase orgânica e 62% (v/v) de fase aquosa de 10 a 14 minutos, voltando à proporção inicial de 15 a 20 minutos.

Um cromatograma característico da eluição das sulfonamidas e trimetoprima nas condições ótimas de análise está apresentado na **Figura I.4.1**.

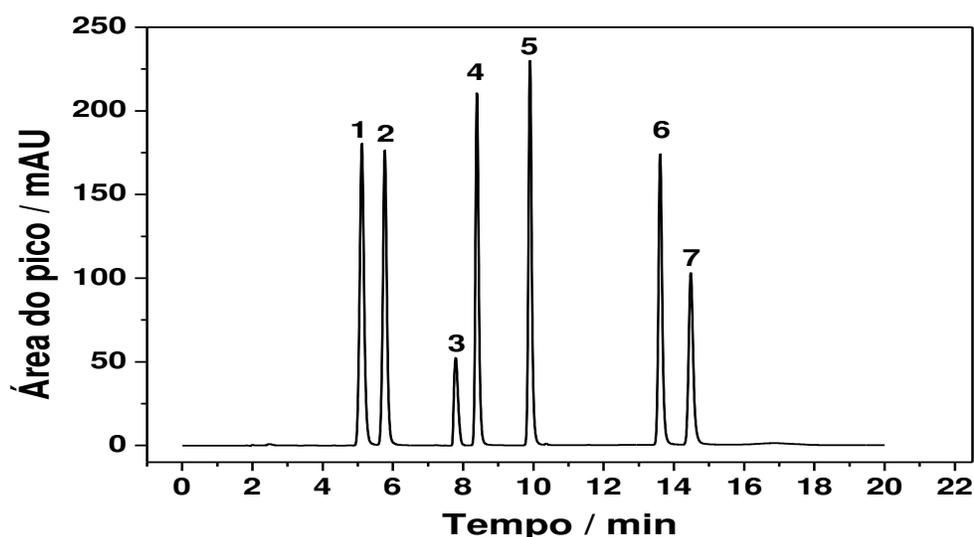


Figura I.4. 1. Cromatograma característico das sulfonamidas e trimetoprima: 1) Sulfadiazina (SDZ), 2) sulfatiazol (STZ), 3) trimetoprima (TMTP), 4) sulfametazina (SMZ), 5) sulfametoxazol (SMX), 6) sulfadimetoxina (SDM) e 7) sulfaquinoxalina (SQX), todas a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas: FE - XBridgeTM. Fase móvel - FO (0,1% (v/v) de ácido fórmico em MeOH, FA 0,1% (v/v) de ácido fórmico, pH 3,0). Eluição por gradiente - FO:FA 10:90 (v/v) para 38:62 (v/v) em 10 min; FO:FA 38:62 (v/v) por 10 a 14 min; voltando a proporção inicial FO:FA 10:90 (v/v) de 15 a 20 min. Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$. Temperatura da coluna: $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

As sulfonamidas de interesse (SDZ, SDM e SQX) possuem, nas condições de estudo, um tempo de retenção de 5,1 minutos, 13,6 minutos e 14,5 minutos, respectivamente. O comprimento de onda de máxima absorção para a quantificação de SDZ, SDM e SQX foi de 266 nm, 268 nm e 248 nm, respectivamente.

Com as condições cromatográficas selecionadas foram então verificados os parâmetros de conformidade do sistema de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos pela Farmacopeia Americana (USP, 2007).

A monografia da SDZ e SDM na farmacopeia americana estabelece que o fator de alargamento (*tailing factor*) não seja maior que 1,5 e a estimativa do desvio padrão relativo para as replicatas de injeções não seja maior que 2,0%. A monografia

da SQX na farmacopeia americana estabelece que a eficiência da coluna não seja inferior a 2500 pratos e o fator de alargamento (*tailing factor*) não seja maior que 1,2 e a estimativa do desvio padrão relativo para replicatas de injeções não seja maior que 2,0%. Dessa forma, a otimização do método para a quantificação das sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) visou estes parâmetros, além daqueles descritos no item III.3.4.3.1.

A **Tabela I.4.1** apresenta os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para as condições estabelecidas. Com estas condições foi obtida simetria adequada do pico cromatográfico de SDZ, SDM e SQX com tempo de retenção relativamente curto; além de estar de acordo com as especificações exigidas pela farmacopeia americana (USP, 2007) e com os critérios de aceitação estabelecidos na seção III.3.4.3.1 (Shabir, 2003).

Tabela I.4. 1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para as sulfonamidas (SA): SDZ, SDM e SQX.

SA	Parâmetros de conformidade					
	t _R	N	Rs*	As	k	TF
SDZ	5,1	8152	-	1,2	1,77	1,1
SDM	13,6	82284	20,8	1,2	5,54	1,2
SQX	14,5	67567	4,21	1,2	5,96	1,2

* Rs obtida em relação ao pico cromatográfico antecedente (Figura I.4.1).

Para todos os outros picos cromatográficos apresentados na **Figura I.4.1**, a resolução foi maior que 2. Portanto, com as condições cromatográficas otimizadas foi possível prosseguir com o estudo da estabilidade das soluções, para em seguida ser realizada a validação do método.

1.4.1.2. Estabilidade das soluções de SDZ, SDM e SQX

Anterior ao procedimento de validação, estudos referentes à estabilidade das substâncias SDZ, SDM e SQX foram realizadas.

A avaliação da estabilidade das soluções utilizadas na metodologia analítica é de suma importância, uma vez que a degradação do analito ou dos constituintes da matriz durante a estocagem ou análise da amostra podem afetar a exatidão dos resultados. A estabilidade dos padrões é importante em termos de temperatura, luminosidade e tempo, já que as análises, frequentemente, são realizadas durante todo o dia e/ou à noite.

No presente estudo, as soluções estoque das sulfonamidas SDZ e SDM foram estáveis nas condições estudadas e descritas na **Tabela I.4.1** por um período de 90 dias (**Figura I.4.2** e **Figura I.4.3**, respectivamente). As soluções estoque de SQX armazenadas em frasco âmbar e temperatura ambiente e em frasco transparente à 40 °C (SE_{AA} e SE_{GT}) foram estáveis por um período de 90 dias. No caso da solução estoque armazenada em frasco transparente e temperatura ambiente (SE_{AT}) e da solução de trabalho armazenada em frasco âmbar e temperatura ambiente ($S_{tr(AA)}$) a estabilidade foi de apenas 14 dias e 60 dias, respectivamente (**Figura I.4.4**). O critério de aceitação para a estabilidade das soluções estoque foi de 5%, conforme indicado nas **Figuras I.4.2, I.4.3 e I.4.4** em linhas tracejadas.

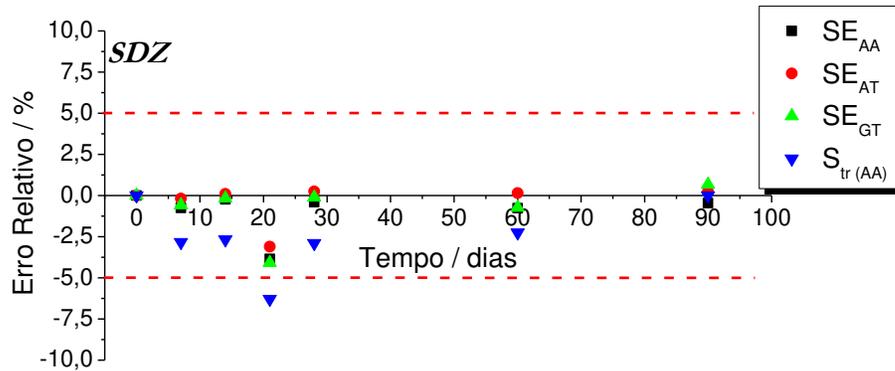


Figura I.4. 2. Estabilidade da solução estoque (SE) de SDZ armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (SE_{AT}); âmbar (SE_{AA}) e em geladeira, 4 °C, em frasco transparente (SE_{GT}) e da solução de trabalho armazenadas à temperatura ambiente em frasco âmbar (S_{tr(AA)}).

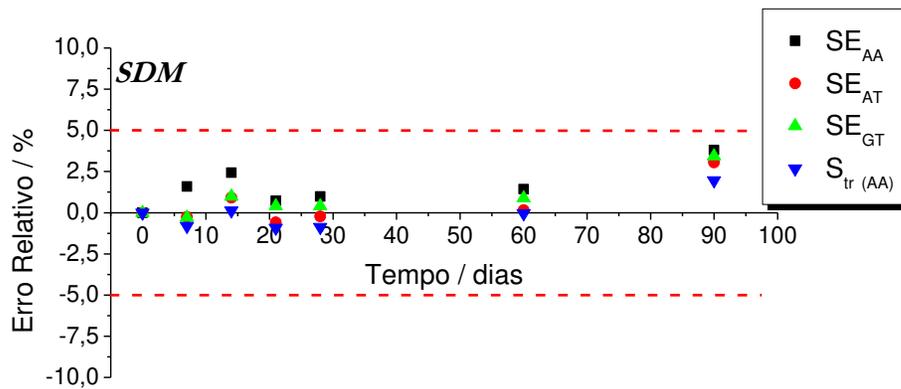


Figura I.4. 3. Estabilidade da solução estoque (SE) de SDM armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (SE_{AT}); âmbar (SE_{AA}) e em geladeira, 4 °C, em frasco transparente (SE_{GT}) e da solução de trabalho armazenadas à temperatura ambiente em frasco âmbar (S_{tr(AA)}).

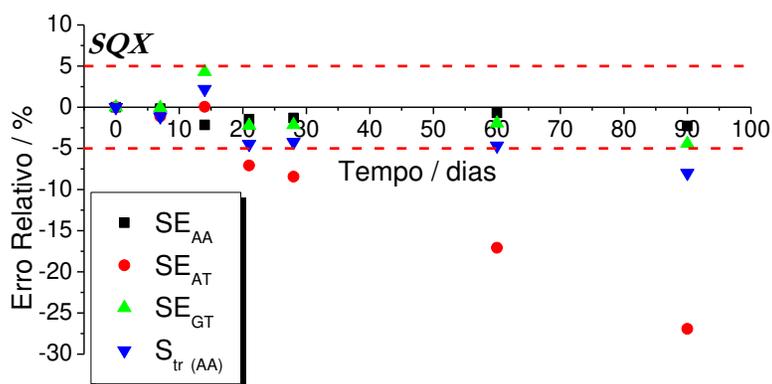


Figura 1.4. 4. Estabilidade da solução estoque (SE) de SQX armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (SE_{AT}); âmbar (SE_{AA}) e em geladeira, 4-8 °C, em frasco transparente (SE_{GT}) e da solução de trabalho armazenadas à temperatura ambiente em frasco âmbar (S_{tr(AA)}).

Portanto, para garantir a estabilidade e obter confiabilidade e repetitividade dos resultados, as soluções estoque das sulfonamidas em estudo (SDZ, SDM e SQX) foram preparadas em metanol, armazenadas em frasco âmbar, estocadas a 4°C por um tempo máximo de três meses e as soluções de trabalho foram preparadas diariamente a partir das respectivas soluções estoque.

1.4.1.3. Validação dos métodos para a quantificação das sulfonamidas sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX) em fármacos de uso veterinário

O desenvolvimento do método analítico envolve processos de avaliação que estimem sua eficiência na rotina do laboratório. A finalidade da validação consiste em comprovar que o método analítico é adequado para o seu propósito. Assim, após estabelecidas as condições cromatográficas para a quantificação de SDZ, SDM e SQX por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (HPLC-DAD), o método desenvolvido foi validado com base na Resolução nº 899, de

29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e quando possível, também foram contempladas as recomendações do Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica - Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários (MAPA, 2011^o). Os parâmetros avaliados foram: seletividade, faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, exatidão e robustez.

Segundo a resolução da ANVISA (2003) e o Guia de Validação do MAPA (2011^o), os ensaios necessários para a validação do método analítico é selecionado segundo sua finalidade, conforme apresentado no item I.1.4.1. Em estudos quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos (Categoria I), parâmetros como limite de detecção e quantificação não são classificados como necessários.

I.4.1.3.1. Seletividade

A seletividade do método é a capacidade que o método possui de identificar um composto inequivocamente na presença de outros componentes (impurezas, componentes da matriz e/ou produtos de degradação). Esta foi avaliada mediante estudo de degradação do fármaco e pelo teste de pureza de picos.

O teste de degradação do fármaco consistiu em submetê-lo a condições extremas (meio ácido, meio básico, meio oxidante e meio aquecido 60 °C) em dois diferentes períodos: uma hora após o preparo das soluções e depois de 24 horas. A análise foi realizada em triplicata.

A solução intermediária do fármaco (100 µg mL⁻¹) foi preparada de acordo com os meios apresentados na **Tabela I.4.2**. Antes de realizar a análise, a solução intermediária da SDZ foi diluída para 15 µg mL⁻¹ e as soluções intermediárias da SDM e SQX foram diluídas para 10 µg mL⁻¹, todas em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa.

Tabela I.4. 2. Condições experimentais utilizadas para avaliar a degradação dos fármacos.

Meio	Condição Experimental
Ácido	HCl 0,1 mol L ⁻¹
Básico	NaOH 0,1 mol L ⁻¹
Oxidante	H ₂ O ₂ 3% (v/v)
Aquecido	Banho maria (T = 60 °C)

A **Figura I.4.5** mostra os cromatogramas das soluções de trabalho da sulfonamida SDZ recém preparada (controle) e das soluções submetidas às condições apresentadas na **Tabela I.4.2**, após o período de 1 e 24 horas.

Os cromatogramas apresentados na **Figura I.4.5** demonstram que não houve formação de produtos de degradação que eluissem no mesmo tempo de retenção da SDZ ($t_R = 7,3$ minutos) em nenhuma das condições de estresse e nos tempos estudados. Os espectros de UV (**Anexo 1**) obtidos para a SDZ nas condições dos estudos de degradação foram idênticos aos espectros da SDZ nas soluções recém preparadas (controle). Estes resultados comprovam que o método é seletivo frente às condições e parâmetros cromatográficos previamente otimizados. Ainda foi observado que não houve diminuição significativa da área do pico cromatográfico (menor que 5%) da SDZ nos meios de estresse estudados mostrando estabilidade, no período estudado, frente a estes meios.

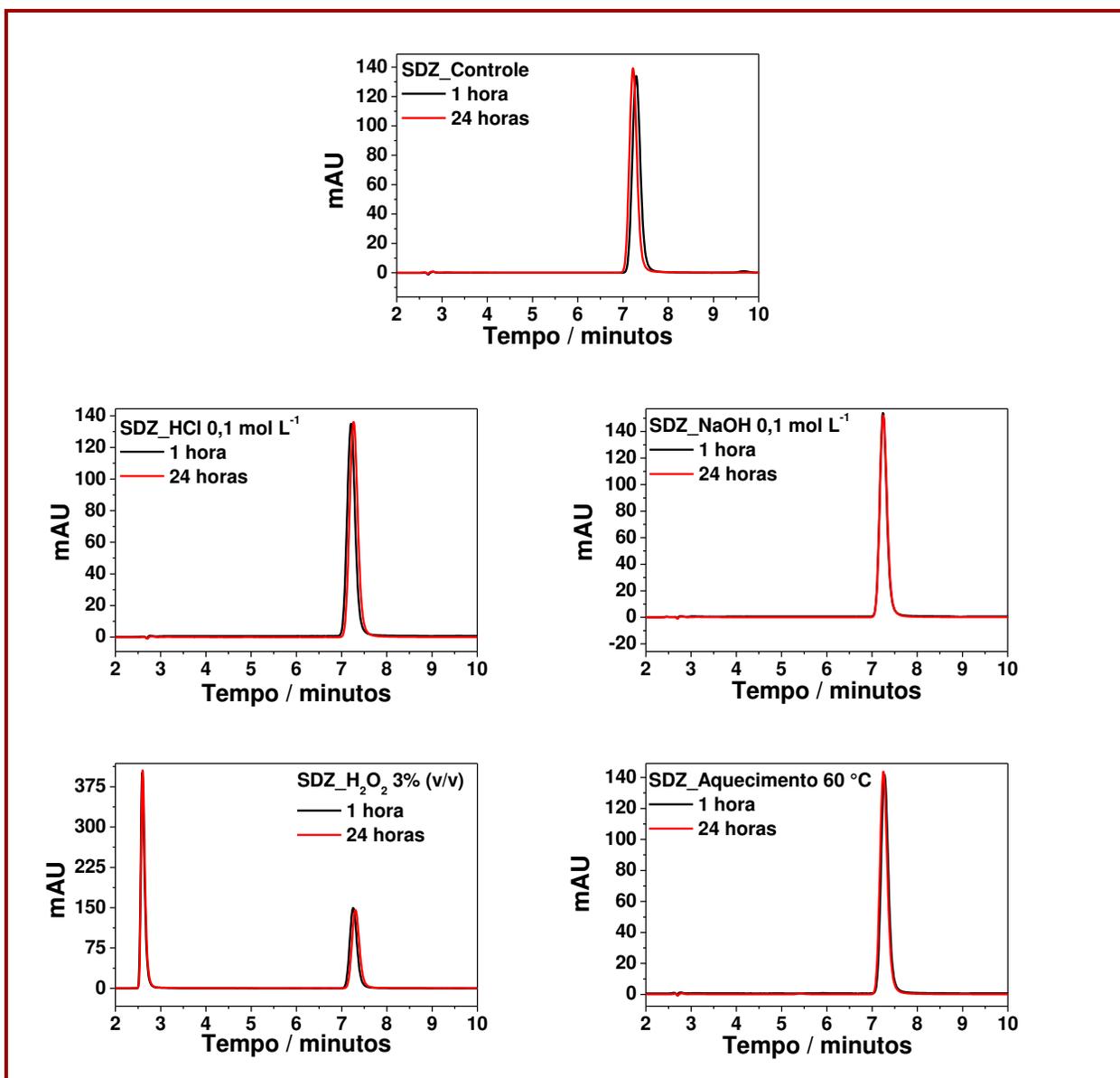


Figura I.4. 5. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de SDZ submetidas às condições apresentadas na Tabela I.4.2, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: FE - XBridgeTM. Fase móvel - FO (0,1% (v/v) de ácido fórmico em MeOH), FA (solução 0,1% (v/v) de ácido fórmico). Eluição por gradiente: 12% (v/v) de FO e 88% de FA de 0 a 8 minutos; sendo mudado para 85% (v/v) de FO e 15% (v/v) de FA de 9 a 14 minutos; voltando à proporção inicial de 15 a 20 minutos. Volume de injeção: 20 μ L. Temperatura da coluna: 40 °C. Concentração de SDZ: 15 μ g mL⁻¹.

A **Figura I.4.6** mostra os cromatogramas das soluções de trabalho da sulfonamida SDM recém preparadas e das soluções submetidas às condições de estresse apresentadas na **Tabela I.4.2**, após o período de 1 e 24 horas.

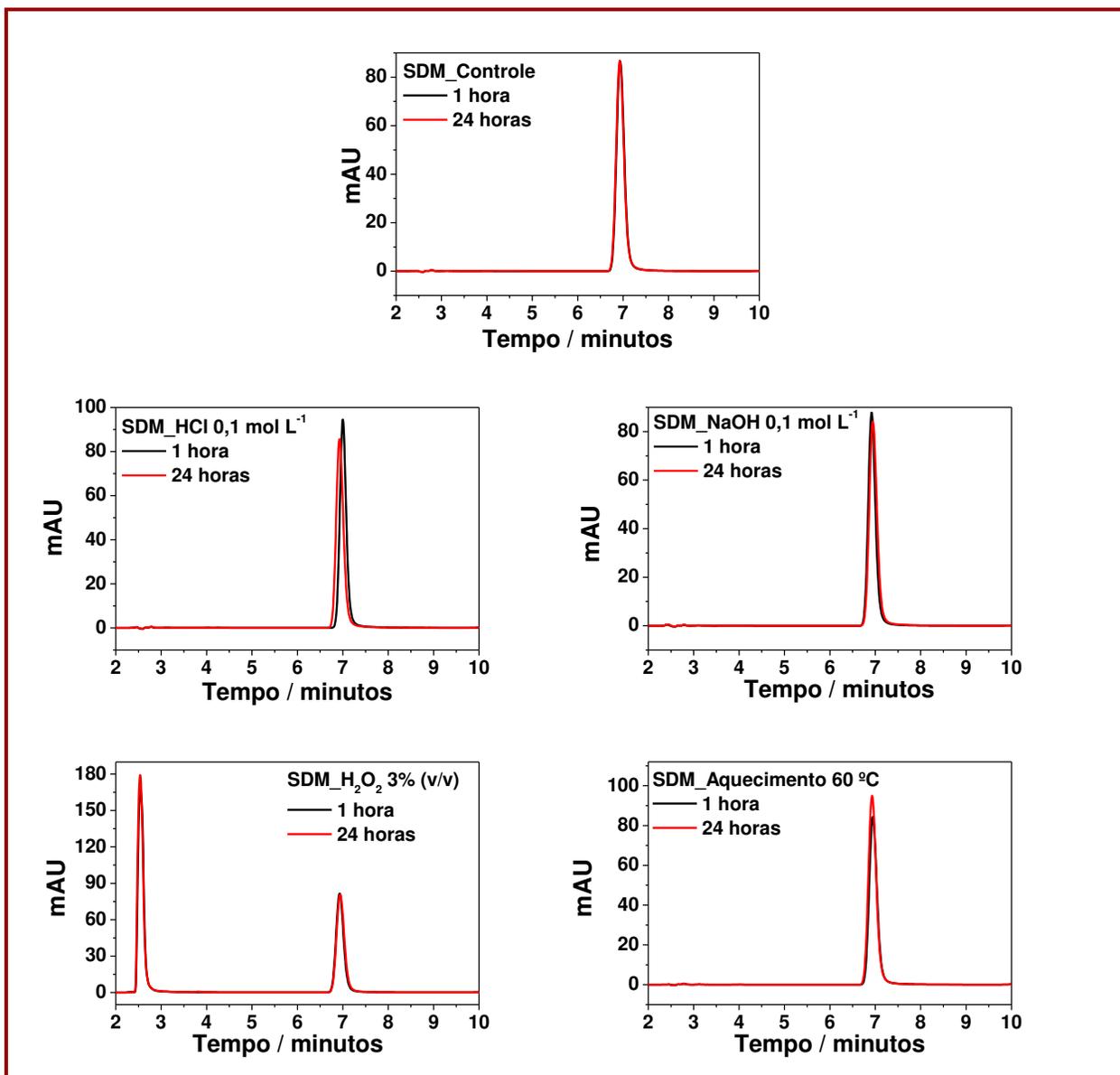


Figura I.4. 6. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de SDM submetidas às condições apresentadas na Tabela I.4.2, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: FE - XBridgeTM. Fase móvel - FO (0,1% (v/v) de ácido fórmico em MeOH), FA (solução de 0,1% (v/v) de ácido fórmico). Eluição isocrática - FO:FA 40:60 (v/v). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Temperatura da coluna: 40 °C. Concentração de SDM: 10 µg mL⁻¹.

Os cromatogramas apresentados na **Figura I.4.6** demonstram que não houve formação de produtos de degradação que eluissem no mesmo tempo de retenção da SDM em nenhuma das condições de estresse e nos tempos estudados. Os espectros UV (**anexo 2**) obtidos para a SDM nas condições dos estudos de degradação foram idênticos aos espectros da SDM nas soluções recém preparadas (controle). Estes resultados comprovam que o método é seletivo frente às condições e parâmetros cromatográficos previamente otimizados. Além disso, é observado que não houve diminuição significativa da área do pico cromatográfico (menor que 5%) da SDM nos meios de estresse estudados mostrando estabilidade, no período estudado, frente a estes meios.

A **Figura I.4.7** mostra os cromatogramas das soluções de trabalho da sulfonamida SQX recém preparadas (controle) e das soluções submetidas às condições de estresse apresentadas na **Tabela I.4.2**, após o período de 1 e 24 horas.

Os cromatogramas apresentados na **Figura I.4.7** demonstram que em meio ácido houve degradação da SQX, uma vez que a área após 24 horas diminuiu consideravelmente em 70%. Porém não houve presença de produtos de degradação no mesmo tempo de retenção da SQX em nenhuma das condições de estresse e nos tempos estudado. Os espectros UV (**anexo 3**) obtidos para a SQX nas condições dos estudos de degradação foram idênticos aos espectros da SQX nas soluções recém preparadas (controle), mostrando assim, que o produto de degradação formado não interferiu na determinação de SQX. Estes resultados comprovam que o método é seletivo frente às condições e parâmetros cromatográficos previamente otimizados.

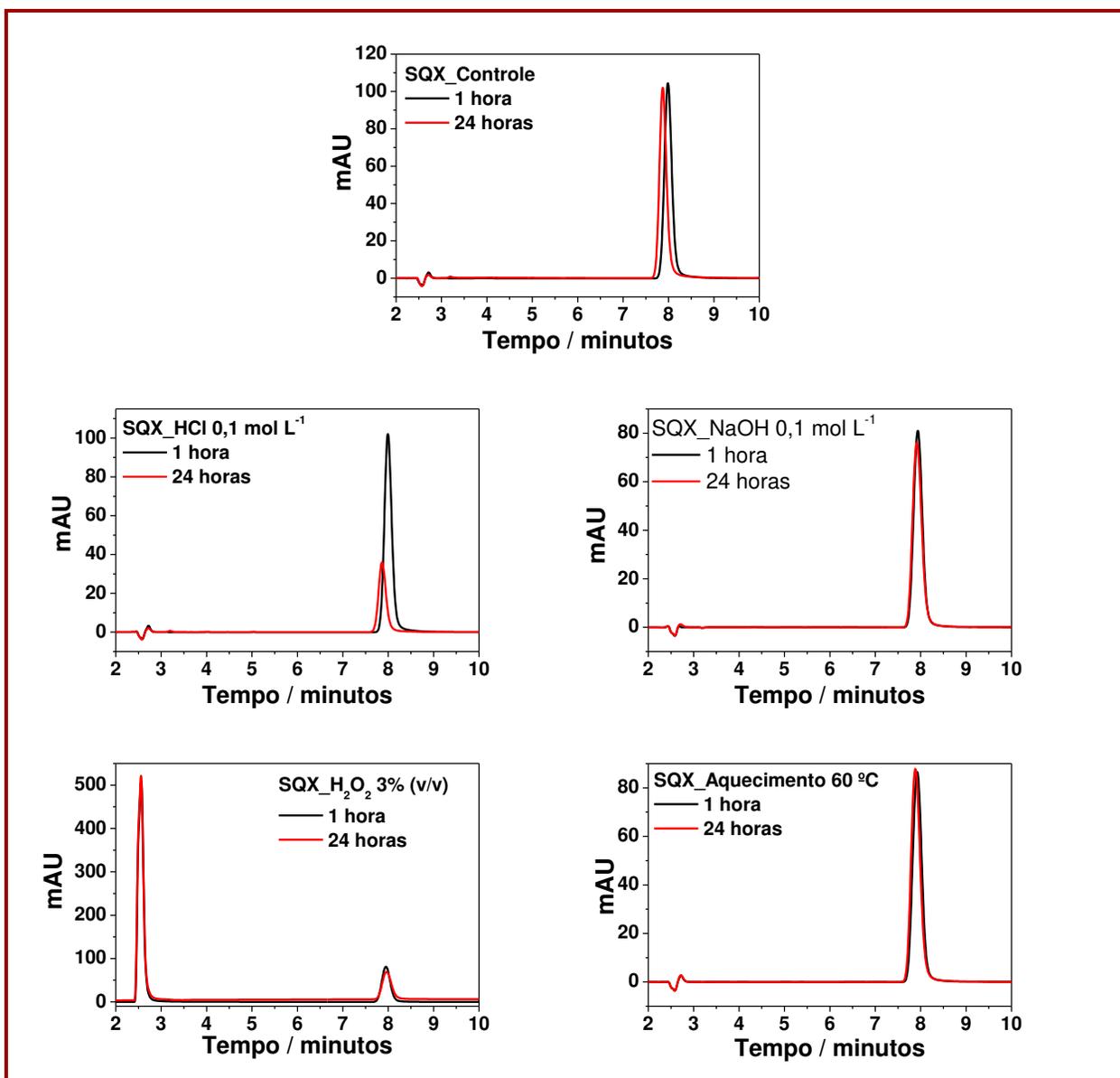


Figura I.4. 7. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de SQX submetidas às condições apresentadas na Tabela I.4.2, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: FE - XBridge™. Fase móvel - FO (0,1% (v/v) de ácido fórmico em MeOH, FA 0,1% (v/v) de ácido fórmico, pH 3,0). Eluição isocrática - FO:FA 40:60 (v/v). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μL. Temperatura da coluna: 40 °C. Concentração de SQX: 10 μg mL⁻¹.

I.4.1.3.2. Curva analítica

A linearidade e a sensibilidade foram obtidas a partir da curva analítica de trabalho (no solvente) que foi construída, dentro do intervalo da faixa linear, pela análise de cinco diferentes concentrações das sulfonamidas SDZ, SDM e SQX, em triplicata, preparadas em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa. Estas concentrações seguiram o intervalo de 50 a 150% em relação à concentração teste (geralmente a concentração estabelecida como ponto médio da curva), embora a ANVISA (2003) recomende que seja no intervalo de 80 a 120%. Essa alteração foi feita, uma vez que a Farmacopeia Americana adota essa faixa, o que consideramos mais adequado. O Guia de Validação do MAPA (2011^o) não recomenda uma faixa específica, no entanto, indica que a curva analítica seja construída em 5 níveis de concentração, preparadas em triplicatas independentes e duplicatas de injeção. Optamos por não realizar a duplicata de injeção, uma vez que a dispersão dos resultados das análises independentes seria maior do que aqueles oriundos da reinjeção das mesmas amostras.

A curva analítica foi estatisticamente avaliada conforme preconiza o Guia de Validação do MAPA (2011^o) quanto a possível presença de valores extremos (*outliers*) (teste de significância dos resíduos e teste de Jackknife) e homocedasticidade (teste de Levene). Todas as curvas analíticas obtidas se mostraram homocedásticas e, portanto, para estabelecer a equação da reta foi empregado o método dos mínimos quadrados ordinários. A faixa de trabalho do método foi de 10 - 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nas condições estudadas. A curva analítica representada pela equação $y = a + b \times C$, onde C é a concentração de cada sulfonamida em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e y a área do pico cromatográfico correspondente para cada sulfonamida. A **Figura I.4.8** mostra as curvas analíticas e os respectivos gráficos de resíduos para a SDZ, SDM e SQX.

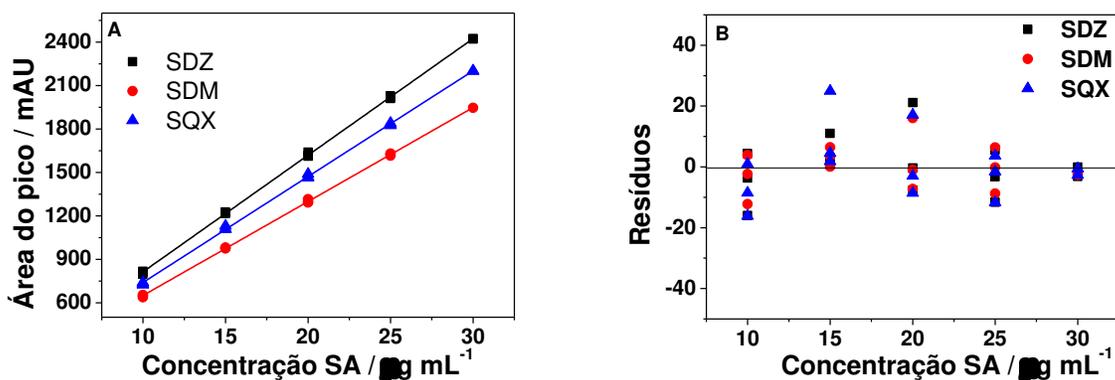


Figura I.4. 8. Curvas analíticas (A) e gráfico de resíduos (B) para SDZ (preto), SDM (vermelho) e SQX (azul).

A **Tabela I.4.3** apresenta os resultados obtidos referentes a faixa linear, linearidade (r) e sensibilidade (coeficiente angular) obtidos pelo método HPLC-DAD.

Tabela I.4. 3. Parâmetros de validação dos métodos de determinação de sulfonamidas em medicamentos de uso veterinário por HPLC-DAD.

Parâmetros de validação (HPLC-DAD)	Sulfonamidas		
	SDZ	SDM	SQX
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10 - 30	10 - 30	10 - 30
Linearidade (r)	0,9997	0,9998	0,9996
Sensibilidade (u.a./ ($\mu\text{g mL}^{-1}$))	80,5	64,9	73,1

u.a.: unidades arbitrárias.

Uma vez que a variância é constante na faixa linear considerada (homocedasticidade), o método dos mínimos quadrados ordinários pode ser aplicado e o valor expresso pelo coeficiente de regressão linear, está de acordo com o critério recomendado pela ANVISA ($r > 0,99$) e pelo Guia de Validação do MAPA.

I.4.1.3.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade (precisão intra-ensaio) e precisão intermediária (precisão inter-ensaio). Para tanto, foram analisadas amostras contendo as sulfonamidas em estudo conforme descrito na parte experimental (item I.3.4.2). Os resultados foram expressos como a estimativa do desvio padrão relativo e estão apresentados na **Tabela I.4.4**. Todos estão em conformidade com o preconizado pela ANVISA que estabelece um RSD < 5%.

No entanto, o Guia de Validação do MAPA preconiza que em condições de repetitividade o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) não deve exceder 2/3 do valor previsto pela Equação de Horwitz. No caso das amostras analisadas, o princípio ativo das amostras 3 a 5-SQX se encontra em uma faixa de concentração entre 10 g kg⁻¹ e 100 g kg⁻¹, o que permite um coeficiente de variação máximo de 2/3 de 2,7%, ou seja, 1,8%. Para o restante das amostras, as quais a precisão foi avaliada (1 e 2-SQX, 1-SDM e 1 a 3-SDZ), o princípio ativo se encontra em uma faixa de concentração entre 100 g kg⁻¹ e 1000 g kg⁻¹, o que permite um coeficiente de variação máximo de 2/3 de 2%, ou seja, 1,3%. Conforme apresentado na **Tabela I.4.4**, os resultados experimentais obtidos também estão em concordância com o preconizado.

Para os ensaios de precisão intermediária, denominada de reprodutibilidade intralaboratorial pelo Guia de Validação do MAPA, o coeficiente de variação não deve exceder o valor preconizado pela Equação de Horwitz. Assim sendo, as amostras 3 a 5-SQX analisadas, o coeficiente de variação não deve exceder 2,7%. Para as amostras 1 e 2-SQX, 1-SDM e 1 a 3-SDZ, o coeficiente de variação não deve exceder 2%. Todos os resultados obtidos estão também em conformidade com esse Guia.

1.4.1.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação conforme recomenda a resolução da ANVISA (2003). Sendo assim, as amostras de medicamentos foram fortificadas em 3 níveis de concentração: baixa (40%), média (50%) e alta (60%) em relação ao valor nominal e todas as análises foram realizadas em triplicata. Os ensaios foram realizados, individualmente, para as três sulfonamidas com medicamentos disponíveis comercialmente. Os resultados obtidos para as amostras analisadas estão apresentados na **Tabela I.4.4**.

O ensaio de fortificação das amostras dos diferentes princípios ativos em três níveis de concentração forneceu valores de recuperação para SDZ, SDM e SQX adequados segundo preconiza a ANVISA, uma vez que se encontram na faixa aceitável de 95 a 105%.

Segundo recomendações do Guia de Validação do MAPA o critério de aceitação de veracidade/recuperação para o teor do princípio ativo nas amostras é previsto pela Equação de Horwitz. Tanto para as amostras com o teor do princípio ativo na faixa de concentração entre 10 g kg^{-1} e 100 g kg^{-1} , quanto para as amostras com o teor na faixa de concentração 10 g kg^{-1} e 100 g kg^{-1} , o intervalo de recuperação aceitável é de 98 a 102%.

Das amostras analisadas e apresentadas na **Tabela I.4.4**, apenas duas se encontram na faixa aceitável de 98 a 102% conforme preconizado pelo Guia de Validação do MAPA, enquanto, cinco estão abaixo de 98% e duas acima de 102%.

Tabela I.4. 4. Valores obtidos para os ensaios de precisão e exatidão das sulfonamidas pelo método HPLC-DAD.

Amostra	Precisão		Exatidão ^d		
	Intra-ensaio ^a	Inter-ensaio ^b	Nível baixo	Nível médio	Nível alto
	(RSD %) ^c	(RSD %)	(40%)	(50%)	(60%)
1-SDZ	0,47	0,56	96,0	96,0	100,0
2-SDZ	0,18	1,40	98,0	97,0	99,0
3-SDZ	0,22	0,97	98,0	104,0	101,5
1-SDM	0,59	0,82	98,0	99,2	99,0
1-SQX	0,67	1,20	101,5	103,3	100,0
2-SQX	0,53	2,00	96,4	98,0	97,5
3-SQX	1,20	2,00	101,0	97,3	99,3
4-SQX	0,64	0,84	99,3	97,0	95,3
5-SQX	0,86	1,30	98,0	95,0	99,0

^a Precisão intra-ensaio (n = 6). ^b Precisão inter-ensaio (n = 12). ^c RSD: Estimativa do desvio padrão relativo (coeficiente de variância). ^d Exatidão (% recuperação, n = 3).

1.4.1.3.5. Robustez

Para os ensaios de robustez foram selecionados parâmetros que poderiam afetar os resultados analíticos na determinação das sulfonamidas pelo método desenvolvido. Os fatores estabelecidos para a SDZ, SDM e SQX estão apresentados na **Tabela I.4.5.**

Tabela I.4. 5. Fatores avaliados no ensaio de robustez para SDZ.

Fatores	Variável (+) ^a	Variável (-) ^b
Concentração de ácido fórmico (A)	0,1% (v/v)	0,12% (v/v)
Vazão da fase móvel (B)	0,7 mL min ⁻¹	0,63 mL min ⁻¹
Proporção do volume da fase móvel (FO:FA) (C)	12:88	10:90
Fabricante de metanol (D)	Tedia	J.T.Baker
* (E)	*	*
Temperatura da coluna (F)	40 °C	38 °C
Comprimento de onda (G)	266 nm	268 nm

^a Experimentos (+) correspondem aos valores nominais; ^b Experimentos (-) correspondem aos valores que foram variados; * **(E)**: para a SDZ (solubilização da amostra: (+) 50% metanol e 50% água; (-) 48% metanol e 52% água); para a SDM (coluna: (+) Waters: C18 (XBridge 150 mm, 4,6 mm; 3,5 μm); (-) Agilent: C18 (Zorbax Eclipse Plus 150 mm, 4,6 mm; 5 μm)) e para a SQX (tempo no ultrassom: (+) 3 minutos; (-) 5 minutos).

A significância dos efeitos (estimados pela **Equação I.3.1**) foi interpretada graficamente e estatisticamente. A interpretação estatística conduz a um valor limite ou efeito crítico ($E_{\text{crítico}}$). Portanto, todos os efeitos em valor absoluto maiores ou iguais a este $E_{\text{crítico}}$ são considerados significantes. O efeito crítico, em geral, é derivado do teste estatístico t de *Student*. Os valores calculados de t , baseados no efeito do fator X, E_X , e no erro padrão de um efeito, $(SE)_e$, são comparados com um valor crítico de t (tabelado), $t_{\text{crítico}}$. O $t_{\text{crítico}}$ depende do número de graus de liberdade associado com $(SE)_e$ e determinado, geralmente, com um nível de 95% de confiança ($p = 0,05$). Por conseguinte, o efeito crítico, $E_{\text{crítico}}$, é calculado como demonstra a **Equação I.4.1**.

$$|E_X| \leftrightarrow E_{\text{crítico}} = t_{\text{crítico}} \times (SE)_e \quad \text{Equação I.4.1}$$

Assim, o efeito crítico obtido com o teste estatístico t de *Student* depende do valor de $t_{crítico}$ e do erro padrão de um efeito (Dejaegher & Heyden, 2007).

Realizando o teste de Youden para oito experimentos e sete variáveis mediante *software Statistica 7.0*, o número de graus de liberdade associado ao erro padrão de um efeito é 8, então, o $t_{crítico}$ é de 2,036 e o erro padrão associado a um efeito é de 4,40 para a SDZ, 5,75 para a SDM e 7,59 para SQX; conseqüentemente, os valores dos efeitos críticos são de 10,15; 13,25 e 17,50, respectivamente.

A seguir, a **Figura I.4.9** mostra o gráfico de pareto dos efeitos padronizados para as três sulfonamidas.

No gráfico de pareto é observado que para as três sulfonamidas, o fator que provoca um efeito significativo é a vazão da fase móvel (Fator B). Lembrando que o intervalo extremo para este nível foi de 10% (SDZ) e 15% (SDM e SQX) do nível nominal, todavia, com um intervalo mais amplo, maior é a probabilidade do efeito do fator correspondente ser significativo. Então, quanto menor o intervalo mais fácil será considerar este fator robusto. Neste teste de robustez, o fator vazão da fase móvel não foi robusto, conseqüentemente deverá ser controlado com maior rigor.

Para a SDM, a coluna também afetou significativamente o método indicando, inclusive, que a coluna Zorbax Eclipse Plus seria mais indicada do que a XBridge™.

Para a SDZ, além do fator B, os fatores E (solubilização da amostra), F (temperatura da coluna) e G (comprimento de onda) também afetaram significativamente o método.

Para a SQX, com exceção do fator D (fabricante de metanol) todos os outros fatores foram estatisticamente significativos.

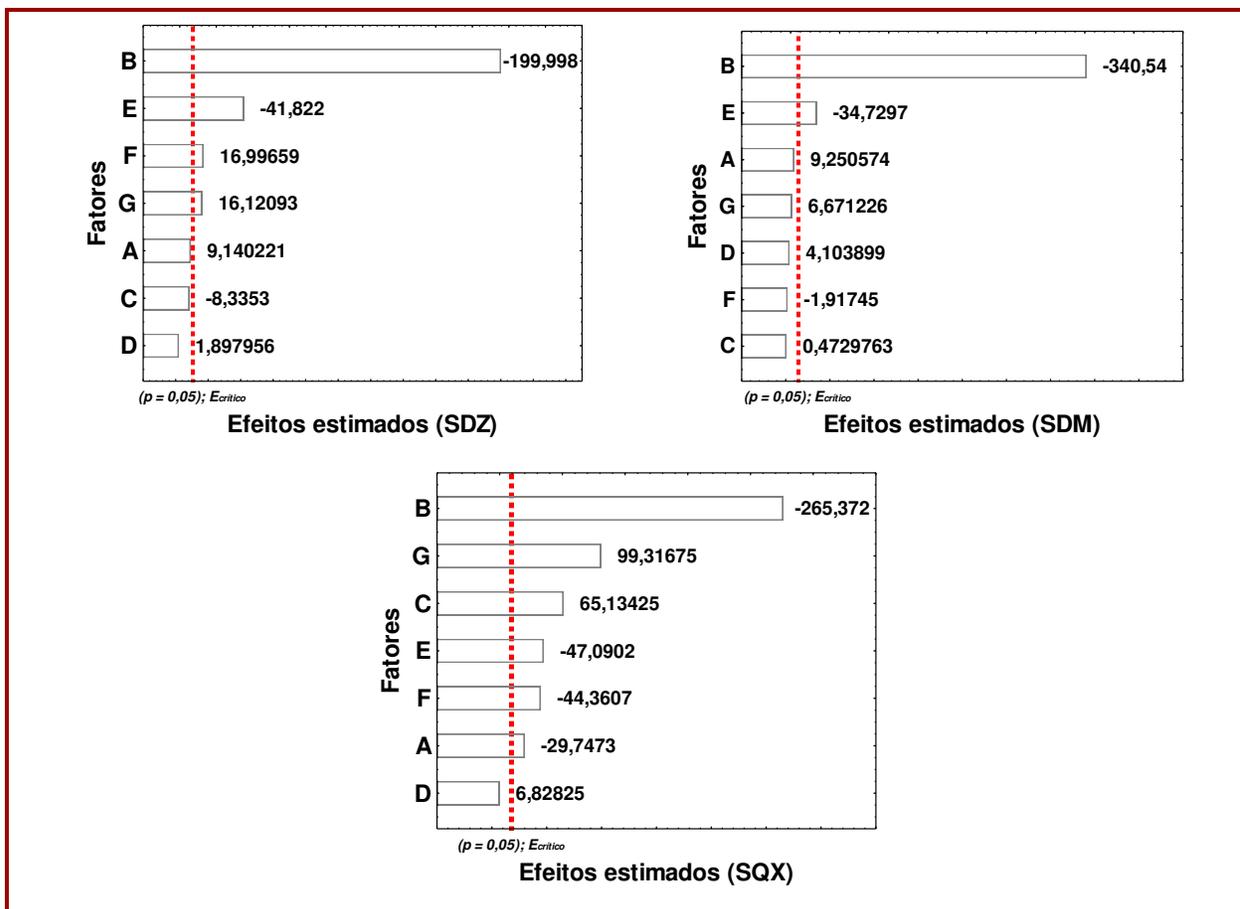


Figura I.4. 9. Gráfico de pareto padronizado para um planejamento fatorial fracionário com oito experimentos ($N = 8$) e sete variáveis; $E_{\text{crítico}}$: valor crítico do efeito.

Como muitos dos efeitos foram significativos para a resposta quantitativa de SDZ, SDM e SQX o método é considerado não robusto para o intervalo do nível selecionado para estes fatores na análise do teste de robustez. Os resultados obtidos para os efeitos ajudam a avaliar se o método precisa de cuidados mais rigorosos a serem tomados quando um ou mais fatores são modificados.

A ANVISA (2003) preconiza que ao constatar susceptibilidade do método a pequenas variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

No entanto, o Guia de Validação do MAPA (2011^c) reporta que caso seja verificado que o método não é influenciado ou é fracamente influenciado por pequenas variações dos fatores, o procedimento analítico é classificado como

“Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina”. No entanto, se o método é fortemente influenciado, o procedimento analítico pode ser classificado em uma das seguintes classes: 1) “Procedimento Analítico Não Robusto e inadequado para as análises de rotina”, 2) “Procedimento Analítico de Uso Restrito” e 3) “Procedimento Analítico Não Robusto e inadequado para as análises de rotina na faixa de variação estudada dos fatores de influência”.

Sendo assim, os fatores deverão ser rigorosamente controlados durante as análises de SDZ, SDM e SQX, bem como o fator comprimento de onda, para não comprometer a reprodutibilidade destas análises pelo método desenvolvido.

1.4.1.4. Quantificação das sulfonamidas: sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX) em amostras comercialmente disponíveis de medicamentos de uso veterinário

Os teores de sulfonamidas nas amostras dos medicamentos foram determinados pelo método desenvolvido e validado. Para cada amostra foi verificado se havia efeito matriz, mediante fortificação das amostras e teste de recuperação. Para tanto, as amostras foram fortificadas em três níveis de concentração (análise em triplicata) conforme descrito na parte experimental (item 1.3.4.3.3). No caso da presença de efeito matriz, ou seja, recuperação fora do intervalo de 95 a 105%, as amostras foram quantificadas pelo método de adição de padrão conforme descrito na parte experimental (item 1.3.4.4).

As amostras 1 a 3-SDZ, 1-SDM e 1 a 5-SQX não apresentaram efeito matriz e, portanto, foram quantificadas por padronização externa. No caso das amostras 5 a 8-SDZ e 6 a 8-SQX apresentaram efeito matriz e, então, estas foram quantificadas por adição de padrão. Os resultados estão apresentados na **Tabela 1.4.6**.

A **Figura 1.4.10** apresenta alguns cromatogramas das amostras de medicamentos veterinários que contem como principal ativo a sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina com os diferentes compostos em associação.

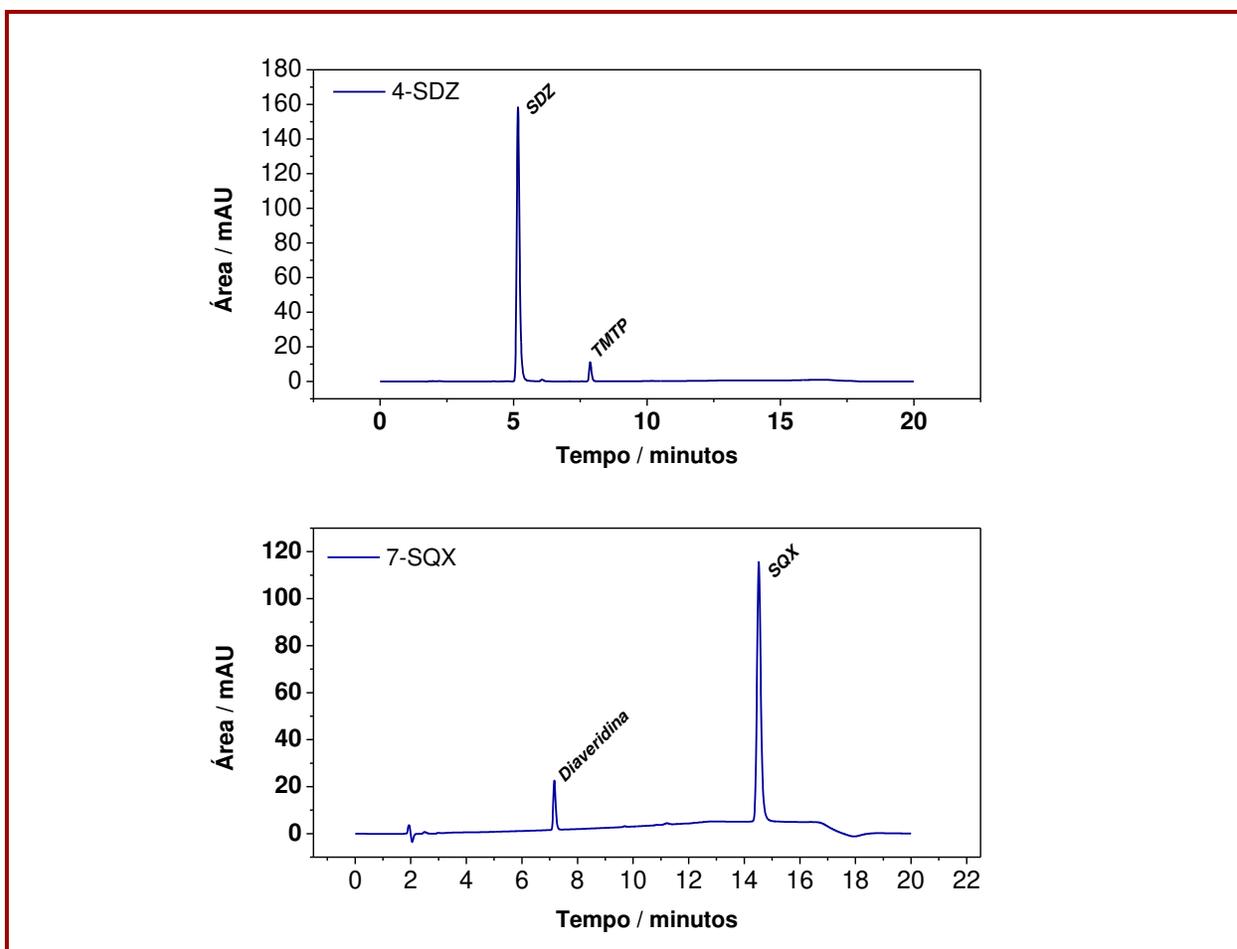


Figura I.4. 10. Cromatogramas de amostras de medicamento veterinário contendo SDZ e SQX como principal ativo e compostos como TMTP (trimetoprima) e diaveridina em associação. Mesmas condições cromatográficas apresentadas na Figura I.4.1.

A resolução da ANVISA (2003) não menciona como os resultados finais das análises devem ser expressos em relação à incerteza ou intervalo de confiança. Geralmente, os resultados são reportados junto com o intervalo de confiança calculado com base no desvio padrão e, na maioria das vezes, a um nível de confiança de 95%. No entanto, o Guia de Validação do MAPA (2011^o) recomenda que o resultado final deve ser reportado junto com a incerteza da medição. Dessa forma, o Guia recomenda usar uma incerteza expandida (U), a qual é obtida pela multiplicação da incerteza padrão combinada (resultado de uma combinação das incertezas de múltiplas fontes) por um fator de abrangência (k). A escolha do fator de

abrangência é baseada na probabilidade de abrangência desejada e no grau de liberdade efetivo da incerteza combinada. Para a maioria das aplicações a probabilidade de abrangência é de 95%, portanto k é igual a 2.

Dessa forma, para expressar os resultados finais das amostras de medicamento veterinários analisados foi utilizada a incerteza expandida (U). Para calcular a incerteza foi utilizada a metodologia *Top-Down* conforme determinação do Guia de Validação do MAPA (2011^o). Neste método foram consideradas a incerteza da curva analítica e a incerteza da precisão intralaboratorial. Não foi considerada a incerteza de amostragem, uma vez que não se tinha esse parâmetro. Para o cálculo da incerteza (U) a **Equação 1.4.2** e **Equação 1.4.3** deve ser empregada.

$$\mu(C_{anal}) = \sqrt{\mu_{amostragem}^2 + \mu_{repro}^2 + (C_{rec} \times \mu_{rec})^2 + \left(\frac{C_{anal}}{C_{analCC}} \times \mu_{calib}\right)^2} \quad \text{Equação 1.4.2}$$

onde: $\mu(C_{anal})$ é a incerteza padrão combinada da concentração do analito na amostra analisada; C_{anal} é a concentração do analito na amostra analisada; C_{analCC} é a concentração do analito interpolada na curva analítica; μ_{repro} é a incerteza de reprodutibilidade obtida dos ensaios de reprodutibilidade ou precisão intermediária; μ_{calib} é a incerteza devido a precisão da concentração do analito na curva analítica; $\mu_{amostragem}$ é a incerteza devida ao processo de amostragem que leva à amostra que chega ao laboratório; C_{anal}/C_{analCC} é o coeficiente de sensibilidade para a incerteza de calibração obtido da equação do mensurando escrita como função da concentração do analito interpolada na curva analítica.

$$U = \mu(C_{anal}) \times k \quad \text{Equação 1.4.3}$$

onde, U é a incerteza expandida e k o fator de abrangência.

Para avaliar se uma amostra está em conformidade ou não com a especificação é necessário consultar a monografia na Farmacopeia. As monografias

das Farmacopeias e outros textos são designados para serem adequados às necessidades das entidades reguladoras, as pessoas envolvidas no controle de qualidade, e os fabricantes de matérias-primas e produtos medicinais. Estas normas devem ser de qualidade adequada como base para a utilização segura dos medicamentos pelos pacientes e consumidores.

As Farmacopeias se dedicam a atividades como produção e certificação de substâncias químicas de referência e padrões, elaboração de formulários nacionais, apoio e incentivo à formação e aperfeiçoamento de recursos humanos na área de controle de qualidade, apoio à pesquisa científica e tecnológica, aprovação e publicação das Denominações Comuns Brasileiras (DCB) (Farmacopeia Brasileira, 2010). As especificações de qualidade dos produtos farmacêuticos e dos insumos utilizados na fabricação de todas as formulações até a embalagem final são de competência legal e exclusiva das Farmacopeias. Essas especificações estabelecem requisitos mínimos da qualidade dos insumos e das especialidades farmacêuticas produzidas em nosso país tanto para relações com comércio exterior quanto como parâmetros para ações da Vigilância Sanitária (Farmacopeia Brasileira, 2010).

De modo geral, para cada medicamento é definido uma faixa aceitável, a qual depende do princípio ativo e da formulação. Cabe destacar, que a farmacopeia brasileira não contempla monografias para medicamentos veterinários e, portanto, não existiria respaldo legal para declarar uma amostra conforme ou não. No entanto, a resolução da ANVISA RDC nº 37, de 6 de Julho de 2009 estabelece que na ausência de monografia oficial de matéria prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais inscritos na Farmacopeia Brasileira, poderão ser adotadas monografia oficial, última edição, de outros compêndios, dentre eles: as Farmacopeias Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Europeia, Francesa, Internacional (OMS), Japonesa, Mexicana e Portuguesa (ANVISA, 2009).

A monografia oficial da sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina está ausente no compêndio nacional. Apenas a sulfadiazina na formulação comprimido se encontra disponível, sendo aceitável no mínimo 95% e, no máximo, 105% do teor nominal (valor declarado no rótulo). Porém, a Farmacopeia Brasileira não apresenta

sessão de monografias para medicamentos de uso animal. A mesma faixa aceitável é preconizada pela Farmacopeia Britânica para sulfadiazina em formulação injetável.

A Farmacopeia Americana traz monografias para sulfadimetoxina nas formulações suspensão oral, pó solúvel e comprimidos. O intervalo aceitável para o teor de SDM em todas essas formulações é de 90 a 110% em relação ao teor nominal. Para as amostras contendo sulfaquinoxalina, formulação solução oral, a farmacopeia americana estabelece que o teor de SQX também deve estar no intervalo de 90 a 110% em relação ao teor nominal. Para as amostras contendo sulfadiazina na formulação comprimido, o intervalo aceitável é de 95 a 105% do valor nominal. Para os medicamentos sob as diferentes formulações analisados que não existem monografias descritas nas Farmacopeias Americana (USP XXX, 2007) e Britânica (British Pharmacopoeia, 2009) foi adotado o intervalo de 90 a 110%.

Assim sendo, foi observado que duas das dezessete amostras analisadas não atingiram as especificações determinadas (**Tabela I.4.6**). Nas amostras contendo sulfadiazina como principal ativo, 5 e 8-SDZ, foram encontrados valores abaixo do que o declarado no rótulo, considerando o intervalo aceitável de 95 a 105%, conforme preconiza a Farmacopeia Britânica para formulações injetáveis contendo sulfadiazina.

Tabela I.4. 6. Teores médios de SDZ, SDM e SQX determinados em amostras de medicamentos de uso veterinário por padronização externa ou por adição de padrão.

Amostra	Média ± U^a	Concentração nominal
SDZ		
1-SDZ	411 ± 6 ^b	400 mg/mL
2-SDZ	390 ± 6 ^b	400 mg/mL
3-SDZ	402 ± 8 ^b	400 mg/mL
4-SDZ	400 ± 5 ^b	400 mg/mL
5-SDZ	325 ± 23 ^b	400 mg/mL
6-SDZ	135 ± 4 ^b	137,90 mg/mL
7-SDZ	142 ± 14 ^b	137,90 mg/mL
8-SDZ	315 ± 11 ^b	400 mg/mL
SDM		
1-SDM	22,0 ± 0,4 ^c	20 g/100 mL
SQX		
1-SQX	26,0 ± 0,8 ^d	25 g/100 g
2-SQX	25 ± 1 ^d	25 g/100 g
3-SQX	0,20 ± 0,01 ^e	0,20 g/4 g
4-SQX	4,0 ± 0,1 ^c	4,0 g/100 mL
5-SQX	4,0 ± 0,1 ^c	4,0 g/100 mL
6-SQX	22,0 ± 0,6 ^d	25 g/100 g
7-SQX	15,0 ± 0,6 ^d	15 g/ 100 g
8-SQX	14,3 ± 0,2 ^d	15 g/ 100 g

^a Média ± U (incerteza expandida); ^b mg/100 mL; ^c g/100 mL; ^d g/100 g; ^e g/4 g.

I.5. CONCLUSÕES

O método empregando a HPLC-DAD foi adequado para a separação de seis sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina) e trimetoprima frente aos parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico. Ressaltando que, nas formulações de medicamentos de uso veterinário, as sulfonamidas podem vir associadas a outras sulfonamidas ou outros antimicrobianos e, especialmente, associadas à trimetoprima.

O método desenvolvido para a quantificação de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em medicamentos de uso veterinário por HPLC-DAD foi validado conforme especificações da ANVISA e, frente aos parâmetros de validação e critérios de aceitação preconizados, se mostrou adequado para sua finalidade. A sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina foram selecionadas uma vez que são muito utilizadas no tratamento e profilaxia de aves, bovinos e suínos.

A análise dos medicamentos de uso veterinário demonstrou que das dezessete amostras analisadas duas estavam fora da faixa aceitável de 95 a 105% do valor nominal informado pelo fabricante para amostras contendo sulfadiazina como principal ativo. Esses resultados indicam a necessidade de controle de qualidade dos fármacos de uso veterinário comercializados no Brasil, ressaltando que no Brasil não existe fiscalização de fármacos veterinários e nem monografias específicas para medicamentos de uso veterinário.

- CAPÍTULO II -

ESTUDO DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO DAS

SULFONAMIDAS: SULFADIAZINA (SDZ),

SULFADIMETOXINA (SDM) E SULFAQUINOXALINA

(SQX) EM SOLOS CARACTERÍSTICOS DO ESTADO DE SÃO

PAULO

II.1. INTRODUÇÃO

II.1.1. SOLO E SUAS CARACTERÍSTICAS

O solo é um sistema composto de sólidos (minerais e matéria orgânica), líquido e gases que ocorre sobre a superfície da Terra. O limite superior do solo é a fronteira entre o solo e o ar, águas superficiais, plantas vivas ou materiais de plantas que ainda não começaram a se decompor. O solo tem muitas propriedades que variam com as estações podendo ser, alternadamente, quente e frio ou seco e úmido. A atividade biológica é retardada ou nula se o solo torna-se muito frio ou seco. Recebe matéria orgânica quando as folhas caem ou pela morte de gramíneas. O solo não é estático. O pH, sais solúveis, quantidade de matéria orgânica e razão carbono-nitrogênio, micro-organismos, fauna do solo, temperatura e umidade mudam com as estações climáticas e ao longo dos anos. Além disso, o solo é fortemente afetado pela atividade antropogênica, entre essas as atividades de indústrias, esgotos domésticos e atividades agrícolas as quais muitas vezes resultam na degradação e perda ou redução das funções do solo (USDA, 2010).

A matéria orgânica do solo se refere a todo material orgânico de origem vegetal ou animal decomposto, parcialmente decomposto e não decomposto. É geralmente sinônimo de húmus embora este último seja mais comumente usado para se referir à matéria orgânica decomposta, chamada de substâncias húmicas (SH), as quais contribuem de forma fundamental para as propriedades do solo, como na capacidade de complexação, mobilização e efeito redox de moléculas orgânicas ao meio (xenobióticos) (FAO, 2006).

As substâncias húmicas (SH) são referidas como material macromolecular resistente à biodegradação, heterogêneo e físico-quimicamente ativo. Elas são constituídas de uma mistura de macromoléculas em que não é possível estabelecer um modelo estrutural. Além disso, são importantes elementos do solo, já que regulam o processo de nutrição das plantas, controlam a mobilidade dos íons e a

umidade do mesmo. As SH são fortemente ligadas à porção mineral do solo e podem ser classificadas em três frações separadas referentes às suas propriedades de solubilidade (Chesworth, 2008), sendo:

- ✓ Ácidos húmicos (AH), os quais podem ser extraídos dos solos com soluções básicas (pH próximo de 8); precipitam em meio ácido (pH ente 1 a 5).
- ✓ Ácidos fúlvicos (AF), os quais possuem uma coloração amarelada e são solúveis tanto em meio básico quanto ácido.
- ✓ Huminas, as quais são insolúveis em solução básicas e ácida.

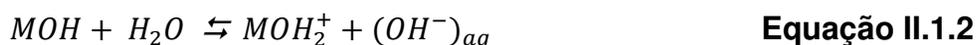
Apesar de não ter uma estrutura química definida, as substâncias húmicas contêm alta concentração de grupos fenólicos e grupos carboxílicos. Esses grupos são importantes devido as suas cargas negativas obtidas por dissociação dependendo do pH do meio. Como resultado, as SH possuem uma considerável quantidade de carga negativa as quais influenciam as reações de trocas catiônicas no solo. A quantidade total de carga negativa da matéria orgânica do solo é comumente chamada de capacidade de troca catiônica (CTC).

A fase líquida do solo comumente chamada de solução do solo é composta por uma mistura constituída de água, sais minerais, moléculas de baixa massa molar como aminoácidos, peptídeos e açúcares, além de substâncias húmicas dissolvidas (Foth, 1990).

O intemperismo físico e químico de rochas e minerais resulta numa ampla faixa de tamanho de partículas de pedras, cascalho, areia, silte e partículas muito pequenas de argila. Especificamente, a textura é a proporção relativa de areia, silte e argila no solo. Assim sendo, a fração mineral do solo pode ser classificada de acordo com o tamanho das partículas: areia é a fração de 2,0 a 0,05 mm de diâmetro, silte é a fração entre 0,05 a 0,002 mm e argila é a fração com diâmetro de partícula menor que 0,002 mm (Chesworth, 2008; Foth, 1990).

A argila apresenta uma grande área superficial e normalmente possui uma carga líquida negativa e, conseqüentemente, funciona como sítio ativo para reações químicas que ocorrem no solo. Os principais componentes da argila são os filossilicatos e óxidos de ferro, manganês, alumínio e de silício. Os óxidos de ferro e alumínio, característicos de regiões muito intemperizadas como as tropicais,

influenciam significativamente nas propriedades dos solos, entre elas a adsorção de íons e moléculas, agregação e comportamento redox. A adsorção de compostos na superfície destes óxidos se dá por meio de grupos M-OH com propriedades dependentes ácido-base que influenciam a ionização, conforme **Equações II.1.1 e II.1.2:**



Assim sendo, em valores de pH mais elevados, a forma aniônica prevalece. Por outro lado, com a diminuição do pH, a forma catiônica predomina e, em determinado valor de pH (ponto isoelétrico ou ponto de carga zero - pH_{PCZ}), a densidade de cargas positivas (MOH_2^{+}) e negativas (MO^{-}) será igual a zero (Chesworth, 2008).

O solo pode ser classificado de acordo com a fração de areia, silte e argila em diferentes classes texturais, conforme diagrama mostrado na **Figura II.1.1.**

Os diversos esquemas de classificação do solo desenvolvidos ao longo dos anos refletem em diferentes visões e conceitos da formação do solo e diferenças de opiniões sobre os critérios a serem utilizados para a classificação.

A classificação de solos no Brasil tem sido matéria de interesse, especialmente motivada pela necessidade de levantamentos pedológicos. A classificação pedológica nacional vigente consiste em uma evolução do antigo sistema americano, formulado por Baldwin, Kellogg e Thorp em 1938, modificada por Thorp e Smith em 1949. Os conceitos centrais do antigo sistema americano foram a base da atual classificação brasileira cujo esquema atual descende de modificações de critérios, alteração de conceitos, criação de novas classes, desmembramento de algumas classes originais e formalização de reconhecimento de subclasses de natureza transicional ou intermediária (Embrapa, 2009).

Desta forma, conforme foi avançando o conhecimento das características dos solos brasileiro foi necessária a criação de uma taxonomia adequada ao perfil nacional. O Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SBCS) é uma prioridade nacional compartilhada com várias instituições de ensino e pesquisa no Brasil, desde a década de 1970. Em 1999, o novo sistema de classificação de solos foi oficialmente publicado para substituir o que vinha sendo utilizado e, em agosto de 2006 foi lançada a 2ª edição do SBCS e revisada em setembro de 2009 (Embrapa, 2006 e 2009). Apresenta seis níveis categóricos, que incluem, até o momento, catorze classes no primeiro nível (ordem); 44, no segundo (subordem), 150, no terceiro (grande grupo), e 580 classes, no quarto nível categórico (subgrupo). Nos quinto e sexto níveis categóricos (família e série, respectivamente), o número de classes é imprevisível, porque serão criadas na medida em que forem identificadas, descritas e relatadas no país. Todas as classes foram definidas com base em atributos e propriedades diagnósticas dos solos (Embrapa, 1999).

Mapas pedológicos, publicados nas últimas décadas, tem comportado uma série de modificações de nomenclatura nas suas legendas em razão da evolução do sistema brasileiro de classificação de solos. Em março de 2012, foi lançado pela Embrapa o novo Mapa de Solos do Brasil utilizando o novo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Embrapa, 2009). Esta atualização utiliza os mais recentes

levantamentos de solos, trazendo um avanço na classificação taxonômica. O Mapa de Solos do Brasil identifica e cartografa os diferentes tipos de solos encontrados no Brasil. Reúne informações e conhecimentos produzidos ao longo de 50 anos de ciência do solo no Brasil, reflexo do avançado estágio de conhecimento técnico-científico dos solos tropicais pela comunidade científica brasileira. Para sua elaboração, foram utilizados os levantamentos exploratórios de solos produzidos pelo Projeto RadamBrasil ao longo das décadas de 1970 e 1980, complementados por outros estudos mais detalhados de solos produzidos principalmente pela Embrapa e IBGE (Embrapa, 2012).

Este mapa é um instrumento básico para subsidiar estudos, com informações atualizadas sobre os recursos dos solos brasileiros, representando uma ferramenta imprescindível para todos que tem no recuso solo o objetivo de sua atuação.

II.1.1.2. Pedologia: Solos característicos do Estado de São Paulo

Este projeto foi desenvolvido utilizando quatro tipos de solos do Estado de São Paulo: Neossolos quartzarênicos, Latossolos vermelhos, Latossolos vermelho-amarelos, Argilossolos vermelho-amarelos, conforme nomenclatura Embrapa (1999). Estes solos foram escolhidos, por orientação do Dr. Manoel Dornelas de Souza (Embrapa-Meio Ambiente, Jaguariúna), por serem característicos dos solos mais encontrados no Estado de São Paulo. Durante o projeto foi possível elaborar um mapa apresentando estes quatro tipos de solos, bem como foi calculado a superfície coberta por cada um deles. O banco de dados do mapa digital dos solos do Estado de São Paulo foi graciosamente cedido pelo Dr. Jener Fernando Leite de Moraes, pesquisador do Laboratório de Geoprocessamento do Instituto Agrônomo de Campinas. O mapa apresentado na **Figura II.1.2**, foi elaborado por tratamento dos dados em programa ARC-GIS, com a colaboração do Dr. Adelsom Soares Filho, do Instituto de Geociências da Unicamp. Foi possível calcular que os Argilossolos vermelho-amarelos cobrem 41,2% da superfície do estado, os Latossolos vermelhos

30,2%, Latossolos vermelho-amarelos 9,4% e os Neossolos quartzarênicos 3,6%. Estes quatro solos cobrem, portanto, 84,4% de toda a superfície do estado.

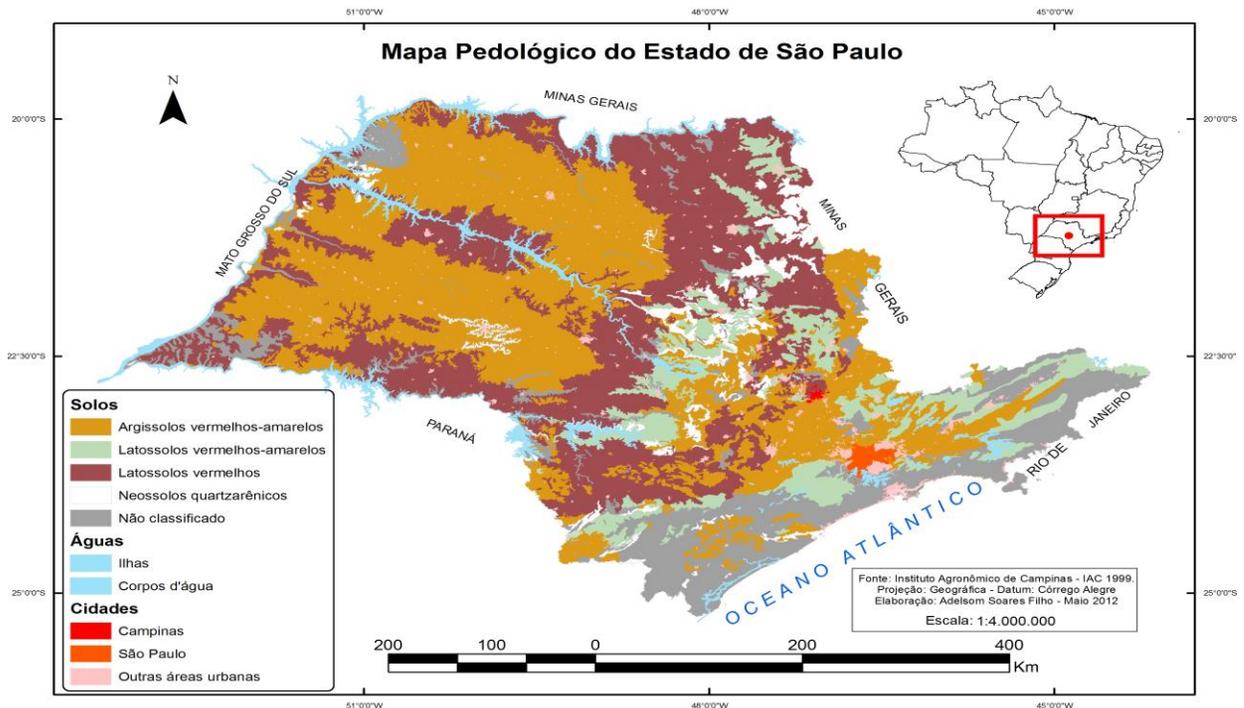


Figura II.1. 2. Mapa pedológico do Estado de São Paulo com os quatro principais tipos de solo.

II.1.2. RESÍDUO DE ANTIMICROBIANOS NO MEIO AMBIENTE E SUAS CONSEQUÊNCIAS

As classes de antimicrobianos mais amplamente empregadas na medicina veterinária incluem tetraciclina, macrolídeos, penicilinas, aminoglicosídeos e sulfonamidas. Estes são compostos que inibem o crescimento de determinados micro-organismos, podendo ser utilizado na produção animal para tratar enfermidades, prevenir contra enfermidades causadas pela presença de micro-organismos e melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento), sendo este último banido desde 2006.

A análise de resíduos de antimicrobianos é um assunto vital dos programas de monitoramento estabelecidos pelas agências regulamentadoras em praticamente todos os países envolvidos com exportação e importação de alimentos. Durante muito tempo esta foi a principal preocupação dos legisladores e pesquisadores da área. Todavia, recentemente o foco de estudo a respeito dos resíduos de antimicrobianos tem se voltado também para o impacto destes compostos sobre o ambiente. O comportamento e destino de antimicrobianos em solo tem sido reconhecido como uma das questões emergentes em química ambiental (Kemper, 2008; Díaz-Cruz *et al.*, 2003; Sarmah *et al.*, 2006).

Os antimicrobianos são administrados aos animais por meio da alimentação ou água de beber, por injeção, colar, oralmente, topicamente, *pour on*, entre outras (Sarmah *et al.*, 2006). Muitos antimicrobianos administrados em animais não são completamente absorvidos pelo organismo do animal sendo excretados como composto original ou como metabólitos. Em animais destinados a produção de alimentos são pouco absorvidos pelo intestino do animal, resultando na excreção de 30 – 90% do composto original. Como a maioria dos antimicrobianos são solúveis em água, tanto 90% de uma dose pode ser excretada pela urina como até 75% pelas fezes do animal (Halling-Sørensen, 2001). Adicionalmente, os metabólitos podem também ser bioativos e podem ser transformados novamente no composto de origem após excreção. Assim, uma porcentagem considerável de antimicrobianos administrados pode ser excretada no meio ambiente na sua forma ativa. A taxa de excreção depende, entre outros fatores, das propriedades físico-químicas do fármaco, do modo de aplicação, da espécie animal e da duração do tratamento (Kemper, 2008).

Deste modo, grandes quantidades destas substâncias são lançadas no meio ambiente a cada ano, o que faz com que os impactos causados por sua dispersão alcancem grandes proporções, à medida que as águas superficiais e subterrâneas, o ar, solos, plantas e organismos terrestres e aquáticos são ameaçados e a disseminação de bactérias resistentes ocorre no meio ambiente. A extensão do potencial de qualquer exposição indireta aos antimicrobianos por meio do ambiente e

a significância deste potencial à saúde não tem sido adequadamente estabelecida (Capleton *et al.*, 2006).

Existem várias vias de entrada de fármacos no meio ambiente (**Figura II.1.3**). Compostos podem ser liberados no ambiente no processo de manufatura, principalmente via águas residuais. Para fármacos administrados oralmente ou por injeção, na qual a principal via de excreção é pela bile, a principal rota de entrada no ambiente é pela disposição do esterco contaminado para o solo. A aquicultura é outra importante fonte de contaminação já que uma grande proporção dos fármacos administrados, geralmente adicionados à ração, não é ingerida pelos peixes, contaminando desta forma a água (Boxall, 2010).

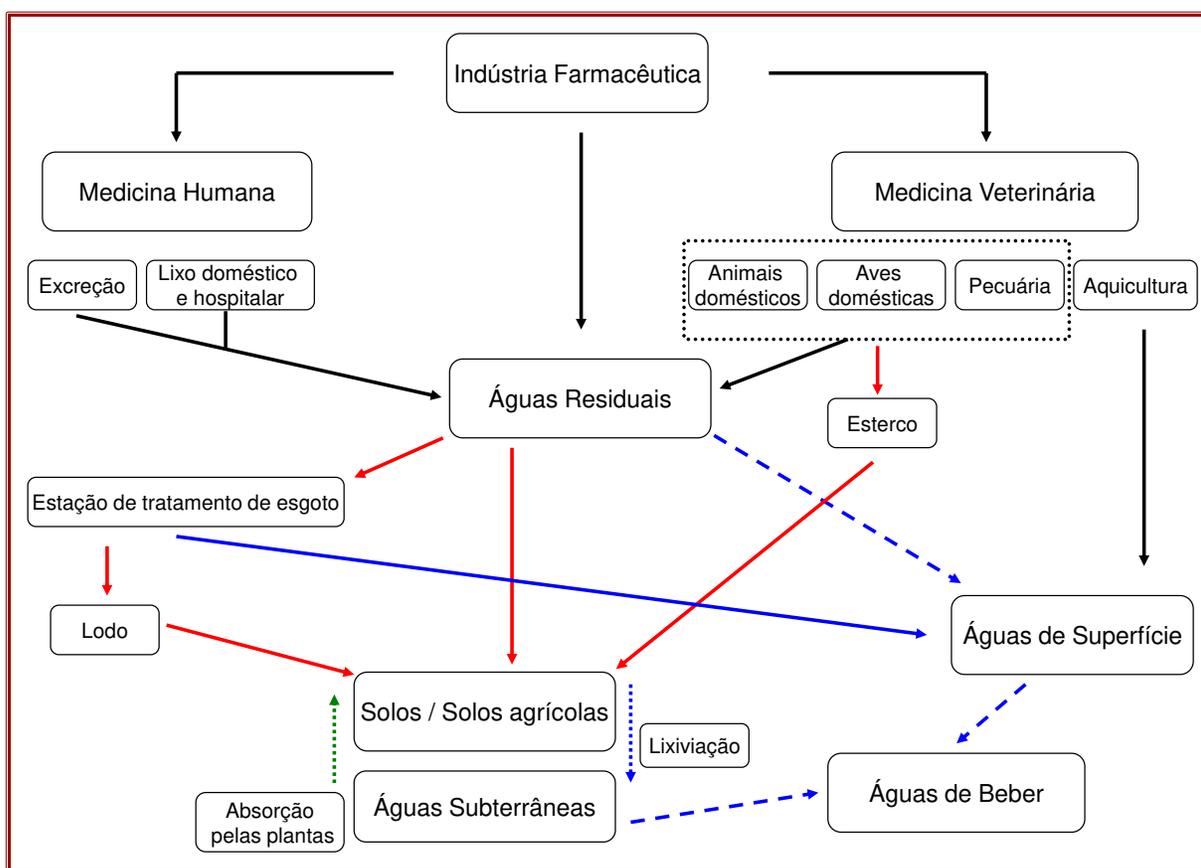


Figura II.1. 3. Possíveis vias de exposição ambiental devido ao uso de medicamentos veterinários. Figura adaptada da referência Andreu *et al.*, 2007

Uma vez no ambiente, os antimicrobianos passam por inúmeros processos os quais determinam sua dispersão ou persistência. Estes processos dependem das propriedades físico-químicas do composto, condições climáticas, tipo de solo e uma variedade de outros fatores ambientais.

A persistência de um determinado antimicrobiano em sedimentos ou solos depende em grande parte da fotoestabilidade, da sua capacidade de adsorção e/ou ligação, da sua taxa de degradação e da lixiviação para águas superficiais e/ou subterrâneas. Antimicrobianos fortemente adsorvidos tendem a se acumular no solo ou sedimentos, por outro lado, antimicrobianos com alta mobilidade tendem a contaminar águas por serem lixiviados a águas subterrâneas.

A dispersão e/ou eliminação desses antimicrobianos no solo para o sistema aquático se dá de diferentes maneiras como pela volatilização, lixiviação ou degradação (biodegradação, termodegradação, fotodegradação). A extensão dessas vias de transporte é determinada por uma variedade de fatores que incluem a solubilidade, comportamento de sorção e a persistência do antimicrobiano; a estrutura física, pH, conteúdo de carbono orgânico, capacidade de troca catiônica da matriz solo, e condições climáticas, assim como temperatura e volume e intensidade de chuva.

Até os dias atuais não existem legislações que estabeleçam limites específicos para a concentração de fármacos veterinários, inclusive antimicrobianos, no solo. Somente no ano de 2001 a Agência Europeia para a Avaliação de Produtos Medicinais (EMA) determinou um limite genérico de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fármacos veterinários em solo (EMA, 2007 e 2008).

Uma das abordagens para avaliar o impacto ambiental de antimicrobianos no meio ambiente é baseada nas recomendações da Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos Veterinários (VICH). A avaliação é um processo de duas fases (EMA, 2007 e 2008). Na Fase I, é determinada a concentração ambiental predita do antimicrobiano (ou metabólitos) excretado no solo por meio de fezes e urina. Caso o valor esteja acima de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ deve ser realizada a Fase II, na qual informações são necessárias para avaliar os efeitos dos antimicrobianos e/ou metabólitos em organismos aquáticos e terrestres. Dentre as informações estão as

propriedade físico-químicas, toxicológicas e toxicocinéticas do antimicrobiano, além de informações sobre a degradação e/ou biodegradação e persistência do antimicrobiano no meio ambiente.

Recomendações em estudos aquáticos incluem estudos de toxicidade aguda em *Daphnia* e peixes sendo a mortalidade o ponto final do teste. Os estudos terrestres são realizados em minhoca (mortalidade) e plantas (germinação e crescimento); além disso, os efeitos dos antimicrobianos e/ou metabólitos na taxa de mineralização de nitratos em solo também é determinada para avaliar os impactos dos mesmos em micro-organismos do solo.

Os efeitos dos antimicrobianos em organismos presentes no solo e na água e em espécies de plantas têm sido estudados ao longo dos anos em condições controladas de laboratórios. Batchelder (1981) avaliou em estufas os efeitos de clortetraciclina e tetraciclina em plantas de feijão mulatinho cultivadas em meios contendo nutrientes e mostrou que concentrações relativamente baixas de ambos antimicrobianos podem afetar significativamente o desenvolvimento e crescimento das plantas em soluções nutritivas. Quando o solo foi usado como meio de crescimento (Batchelder, 1982) houve uma grande variação na sensibilidade entre as espécies cultivadas, sendo as plantas de feijão mais sensíveis do que o rabanete comestível a uma concentração de 160 mg L^{-1} de oxitetraciclina e tetraciclina. Migliore *et al.* (1995, 1996) mostraram bioacumulação do antimicrobiano sulfadimetoxina pelas raízes e caule de determinadas espécies de plantas, sendo a bioacumulação maior em raízes do que em caule. A sulfadimetoxina suprimiu o desenvolvimento e crescimento normal pós-germinativo. Consequentemente, as plantas cultivadas podem absorver e acumular em seus tecidos resíduos destes antimicrobianos presentes no solo representando, assim, algum risco indireto ao homem em razão do consumo destas culturas. Yamashita *et al.* (2006) avaliaram os efeitos tóxicos dos antimicrobianos levofloxacina e claritromicina na reprodução de *Daphnia* e mostraram que ambos antimicrobianos tem elevada toxicidade para o crustáceo. Ainda, ensaios com *Daphnia* mostraram que os antimicrobianos tiamulina e ácido oxolínico foram tóxicos após exposição por 48 horas, com valores de EC_{50} de 4,6 e 40 mg L^{-1} , respectivamente (Wollenberger *et al.*, 2000); enquanto sulfametazina

tem um valor de EC_{50} de 202 mg L⁻¹ (De Liguoro *et al.*, 2009). A reprodução deste crustáceo foi prejudicada por oxitetraciclina, sulfadiazina, tetraciclina e tiamulina em concentrações de 5 e 500 mg L⁻¹. Ainda, o ácido oxolínico, estreptomicina e tilosina revelaram ser letais após exposição em longo prazo (Wollenberger *et al.*, 2000).

Entre estes e outros trabalhos reportados na literatura fica evidenciado que a presença de resíduos de antimicrobianos no meio ambiente pode causar efeitos na reprodução e impactos adversos nas fases iniciais da vida de diferentes organismos aquáticos. Além disso, o solo serve como um vasto reservatório para microorganismos os quais são importantes na manutenção da imobilização mineral e processos de decomposição. Em combinação com os efeitos diretos na microflora e outros organismos, os antimicrobianos podem causar mudanças indesejáveis nas populações naturais da microbiota e, conseqüentemente, as bactérias ambientais podem adquirir e fornecer um gene que codifica a resistência (Kemper, 2008).

Estudos experimentais da atividade antimicrobiana de solo contaminado com tetraciclina e tilosina tem mostrado que, apesar destes compostos serem fortemente adsorvidos por partículas de argila, eles permanecem ativos podendo influenciar a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos existentes no ambiente terrestre (Chander *et al.*, 2005). Heuer e Smalla (2007) investigaram os efeitos de estrume de suínos e sulfadiazina em comunidades bacterianas em microcosmos contendo solo, utilizando dois tipos de solos. Em ambos os solos, estrume e sulfadiazina afetaram positivamente os quocientes de culturas de bactérias totais e resistentes a sulfadiazina. Os resultados sugerem que o esterco de suínos tratados aumenta a propagação de resistências aos antimicrobianos nas comunidades bacterianas do solo.

Dessa forma, os antimicrobianos tem o potencial de afetar a comunidade microbiana em sistemas de esgotos e a inibição de bactérias de águas residuais pode afetar seriamente a degradação da matéria orgânica. Uma redução no número de bactérias e alterações nas populações microbianas foi observada em um modelo de sistema de purificação de águas residuais quando diferentes antimicrobianos foram adicionados em concentrações que podem ocorrer em águas residuais hospitalares (Kümerer *et al.*, 2000).

A função dos antimicrobianos para o desenvolvimento e subsistência de uma bactéria ou de populações de bactérias resistentes aos antimicrobianos, especialmente bactérias patogênicas, é ainda objeto para muitos estudos.

II.1.3. INTERAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS COM XENOBIÓTICOS

A matéria orgânica presente nos solos, turfas e sedimentos consiste de uma mistura de produtos em vários estágios de decomposição, resultantes da degradação química e biológica de resíduos vegetais e animais e da atividade microbiana. Essa matéria é chamada de húmus, que pode ainda, ser dividida em substâncias húmicas e substâncias não húmicas. A base da diferenciação é que as substâncias não húmicas são de natureza definida, como, por exemplo, aminoácidos, carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, enquanto substâncias húmicas são de estrutura não definida compondo um grupo de compostos heterogêneos (Huang *et al.*, 2003). A **Figura II.1.4** apresenta uma proposta estrutural de acordo com o modelo de Schulten (1995).

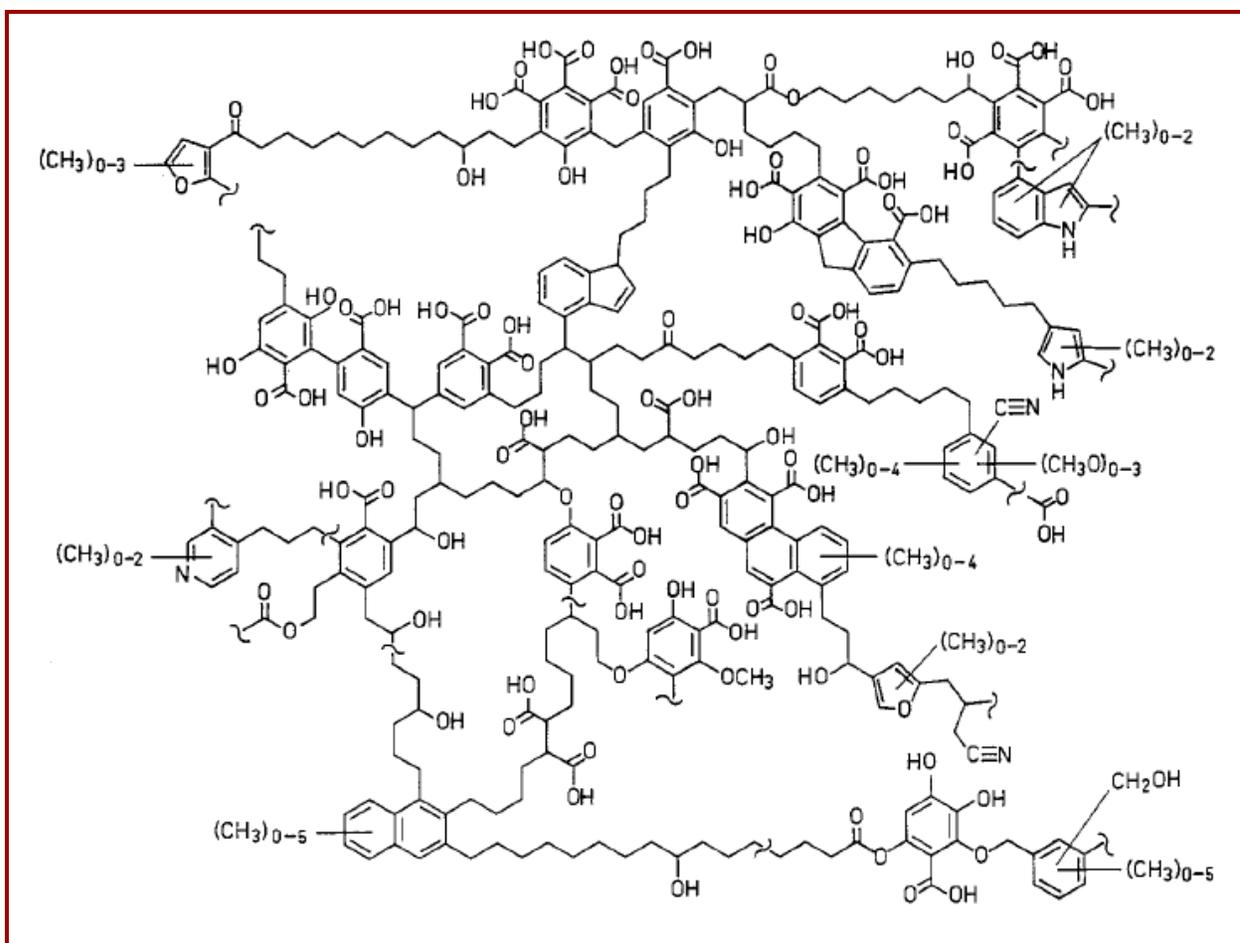


Figura II.1. 4. Estrutura proposta para os ácidos húmicos (Schulten, 1995).

As substâncias húmicas desempenham um papel fundamental nas propriedades do solo uma vez que estão diretamente envolvidos na liberação equilibrada de nutrientes, alta capacidade de troca catiônica, pH, capacidade tamponante e de retenção de metais pesados e xenobióticos (agrotóxicos, fármacos, entre outros) (Amir *et al.*, 2006). A interação das substâncias húmicas com diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos é em função de sua estrutura molecular variada, o que facilita tanto interações de caráter não polar quanto de caráter polar (para compostos orgânicos) e a formação de ligações coordenadas como no caso de metais (Huang *et al.*, 2003).

Os ácidos húmicos representam a fração reativa mais estável da matéria orgânica humificada. Os ácidos húmicos possuem domínios hidrofóbicos e

hidrofílicos e, com isso, pode resultar em complexas interações com xenobióticos. A sorção de compostos químicos orgânicos hidrofóbicos em solos e sedimentos é impulsionada por interações hidrofóbicas, incluindo efeitos entrópicos da fase aquosa e interações não específicas dos compostos químicos orgânicos hidrofóbicos com a matéria orgânica de solo e/ou sedimentos (Huang *et al.*, 2003). Entretanto, troca iônica, ligação com cátions e ligações de hidrogênio tem sido propostas como principais mecanismos de interação dos ácidos húmicos com xenobióticos (Tolls, 2001).

Informações sobre a composição e grupos funcionais dos ácidos húmicos é crítico para compreender a sua reatividade com os xenobióticos (orgânicos e inorgânicos). No entanto, devido a sua complexidade e heterogeneidade é difícil determinar a estrutura dos mesmos. Análise elementar e métodos espectroscópicos como infravermelho, fluorescência e espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem sido usadas para investigar a composição e estrutura dos ácidos húmicos. Entretanto, a primeira etapa para melhor compreender o seu comportamento é a extração das substâncias húmicas (He *et al.*, 2008). Assim é importante o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam extrair substâncias húmicas de solos, com mínimas alterações nas estruturas originais, em tempo relativamente curto, elevado rendimento e baixo teor de contaminantes.

Oleszczuk *et al.* (2009) investigaram os processos de sorção e dessorção do antimicrobiano oxitetraciclina às superfícies nanométricas não polares de carbono, similares a grupamentos alquila e arila dos ácidos húmicos, utilizando isoterms de sorção e modelos cinéticos, observando, assim, uma rápida cinética de sorção e uma dessorção dependente do pH do meio e da quantidade inicial sorvida bem como da agregação intermolecular. Em outro estudo com oxitetraciclina, Kulshrestha *et al.* (2004), utilizando isoterms de Freundlich, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Médio e Difração de Raio X, observaram que a sorção de oxitetraciclina à argila do tipo montmorilonita diminui com o aumento do pH do meio devido à presença de interação por troca catiônica, a qual é mais efetiva em meio ácido; enquanto que a interação hidrofóbica em pH 5 se dá devido ao zwitterion com uma grande quantidade de matéria orgânica dissolvida inibindo a sorção.

Gu *et al.* (2007) demonstraram que a sorção de tetraciclina em ácido húmico de solo foi fortemente dependente do pH com um máximo em pH próximo de 4,3 e da competição com íons hidrônio (H_3O^+) e eletrólito catiônico (Na^+). Além disso, a dependência do pH foi consistente com a complexação entre as espécies catiônica/zwiteriônicas da tetraciclina e sítios desprotonados em ácidos húmicos (principalmente dos grupos funcionais carboxílicos). Ainda, modificações no ácido húmico do solo pela adição de Ca^{2+} aumentou a sorção de tetraciclina sugerindo que a formação do complexo ternário (ácido húmico-metal-tetraciclina) pode ser importante em concentrações mais elevadas do cátion.

É importante ressaltar que ainda não existem estudos no Brasil a respeito da sorção entre antimicrobianos veterinários com a matéria orgânica do solo. E, mesmo obtendo informações na literatura da sorção de antimicrobianos com substâncias húmicas, ainda não se tem definido quais os mecanismos de interação envolvidos ou muito menos o pH ótimo de interação para ácidos húmicos em solos brasileiros dadas as características estruturais destes que dependem da matéria-prima de formação e das características físico-químicas e biológicas do meio, bem como quais as implicações destas interações em solos brasileiros.

II.1.4. ESTUDO DA ADSORÇÃO/DESSORÇÃO DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS EM SOLOS

A associação de contaminantes orgânicos com sedimentos e/ou solos é conhecida como “sorção”. O termo sorção envolve todos os processos em que os antimicrobianos entram em contato com a matriz do solo, sem fazer distinção entre partição, adsorção, absorção e difusão. Adsorção é o contato entre o antimicrobiano e a superfície da matriz do solo, sendo uma interação bidimensional na interface solo-antimicrobiano. A absorção envolve uma penetração tridimensional da molécula na matriz do solo. Partição é a distribuição da molécula entre duas fases (como, por exemplo, gasosa e sólida, ou líquida e sólida), governada por um equilíbrio. Para contaminantes de solo, o termo partição compreende vários processos que resultam

na distribuição entre contaminantes orgânicos hidrofóbicos, a solução do solo e a fase não polar da matriz do solo. A adsorção pode ser considerada um tipo de partição, já que envolve a distribuição de antimicrobianos entre a água dos poros e a matriz do solo. Difusão é um processo de transporte do antimicrobiano para dentro da matriz do solo, colocando-o em contato com maior número de sítios para ele ser sorvido. A difusão pode ser para dentro da matéria orgânica do solo; para dentro de partículas minerais do solo; laminar, sobre a superfície da matriz do solo; e para dentro dos poros da matriz do solo (Ehlers & Loibner, 2006).

Neste trabalho utilizaremos o termo sorção para referir estudos de adsorção bem como dessorção. A adsorção é um processo físico-químico que ocorre quando moléculas de antimicrobianos são atraídas para a superfície da matéria sólida ou para a matéria orgânica do solo por mecanismos químico ou físico, tais como reações de coordenação, interações por transferência de cargas, trocas iônicas, forças de Van de Waals, ligações covalentes ou interações hidrofóbicas. A dessorção estabelece o equilíbrio no sistema do solo e dá informações sobre a reversibilidade das reações, na qual está associada com a superfície do solo (Lavorenti *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos de sorção (adsorção e dessorção) é realizada por meio de medidas de isotermas de sorção em experimentos com frascos sob agitação. Este tipo de experimento geralmente é realizado com a adição de uma determinada quantidade do solo ou sedimento em soluções contendo o analito de interesse ao longo de um intervalo de concentrações. A mistura é em seguida agitada a uma temperatura fixa e a concentração do analito na fase aquosa ou associada à matriz (solo ou sedimento) é medida uma vez que é assumido que o tempo de equilíbrio foi alcançado. Para cada concentração inicial estudada, a concentração do analito na fase sólida (C_s , analito associado ao solo ou sedimento) é traçada em função da concentração do analito na fase aquosa (C_{aq}). O gráfico gerado é conhecido como isoterma de adsorção ou dessorção e sua forma reflete na extensão e, conseqüentemente, a favorabilidade da associação do analito com o solo ou sedimento (Warren *et al.*, 2003).

Vários conceitos de sorção estão disponíveis para descrever a interação de substâncias dissolvidas com o solo. Estes conceitos de sorção diferem em relação à

isoterma de sorção envolvida (linear ou não linear), os pressupostos feitos em relação à dependência com o tempo (instantânea ou um tempo limitado) e reversibilidade do processo de sorção (reversível ou irreversível). Múltiplas regiões de sorção são consideradas nos modelos de sorção para representar a heterogeneidade do solo com relação às suas propriedades de sorção bem como diferenças na acessibilidade de superfícies potencialmente adsorptivas. No entanto, essas regiões de sorção são apenas conceituais e não refletem frações bem definidas do solo (Wehrhan *et al.*, 2007). Assim sendo, o processo de sorção de contaminantes em solos e sedimentos é caracterizado como um fenômeno de reações múltiplas envolvendo diferentes mecanismos de reação.

Sorção, às vezes, é utilizada em vez de adsorção para descrever a perda física do analito da solução de solo (fase aquosa) por meio do contato com o solo sólido.

Adsorção e dessorção são processos complexos e dinâmicos, geralmente simplificados para o sistema solo-analito por meio de modelos de sorção. Vários modelos matemáticos tem sido utilizados para explicar o equilíbrio de distribuição de contaminantes orgânicos entre a fase aquosa e solos e/ou sedimentos. Um dos modelos mais simples é o modelo de distribuição linear que tem como único parâmetro o coeficiente de distribuição (K_D), conforme apresenta a **Equação II.1.3** (Huang *et al.*, 2003).

$$C_s = K_D C_{aq} \quad \text{Equação II.1.3}$$

onde, C_s e C_{aq} são as concentrações do analito na fase sólida e na fase aquosa, respectivamente.

O valor de K_D é uma medida da extensão e favorabilidade da associação do analito com o solo e/ou sedimento. Valores elevados de K_D representam uma forte associação, enquanto valores baixos representam uma fraca associação. A extensão da sorção de um contaminante orgânico em solos, como determinado pelo valor de

K_D , está relacionada fortemente com as propriedades tanto do solo quanto do contaminante (Warren *et al.*, 2003).

A extensão da sorção é, portanto, muitas vezes descrita em termos de coeficiente normalizado pelo carbono orgânico (K_{CO}) (**Equação II.1.4**). Uma redução na variabilidade dos dados é provocada pela normalização de K_D para o teor de carbono orgânico.

$$K_{CO} = \frac{K_D}{f_{CO}} \quad \text{Equação II.1.4}$$

A estimativa de K_D tem sido muitas vezes feita também a partir do coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}), através da **Equação II.1.5**. Isso é feito sob a suposição de que interações hidrofóbicas contribuem para a sorção. Essas estimativas podem oferecer uma ideia de como contaminantes orgânicos realmente se comportam no meio ambiente, desde que os compostos em questão não sejam iônicos e não formem qualquer tipo de ligação específica (complexação com metais, interações iônicas ou ligações de hidrogênio com a matriz) (Loke *et al.*, 2002).

$$\log K_{CO} = a \log K_{OW} + b \quad \text{Equação II.1.5}$$

O modelo de distribuição linear é baseado na hipótese de que a matéria orgânica do solo é como um gel amorfo ou como uma fase líquida que não tem limitação de sítios ou espaços para acomodar moléculas de contaminantes orgânicos com o aumento da concentração do mesmo. A relativa rigidez da matéria orgânica do solo reduz a flexibilidade para acomodar moléculas com o aumento da concentração do soluto na fase aquosa, manifestando, assim, capacidade de adsorção limitada (Huang *et al.*, 2003).

Assim sendo, o modelo mais simples que descreve a adsorção de um composto sobre uma superfície com número finito de sítios sem difusão superficial é o modelo de Langmuir (**Equação II.1.6**) (Yang *et al.*, 2011).

$$C_s = \frac{K_L C_{max} C_{aq}}{1 + K_L C_{aq}} \quad \text{Equação II.1.6}$$

onde, C_{max} é a concentração máxima sorvida no solo e K_L é o coeficiente de sorção de Langmuir (parâmetro relacionado a energia de interação soluto-superfície).

Essa equação indica que ambos C_s e C_{aq} podem ser relacionados linearmente como mostra a **Equação II.1.3** quando $C_{aq} \ll K_L$ e que C_s se aproxima de C_{max} quando $C_{aq} \gg K_L$. Este modelo é estritamente aplicado em adsorventes com energia de superfície homogênea para interagir com o adsorbato e não é apropriado para adsorção de contaminantes orgânicos em solos e sedimentos.

O modelo mais comumente utilizado para quantificar o equilíbrio de adsorção de contaminantes orgânicos em solos e/ou sedimentos é o modelo de Freundlich que é apresentado na **Equação II.1.7** (Huang *et al.*, 2003).

$$C_s(eq) = K_F \times C_{aq}^{1/n} (eq) \quad \text{Equação II.1.7}$$

onde, K_F ($\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$) é o coeficiente de sorção de Freundlich e $1/n$ é o coeficiente angular (expoente de Freundlich, fator de heterogeneidade do sítio de energia ou fator de linearidade - é uma constante que descreve a intensidade de sorção).

A isoterma de Freundlich pode ser linearizada na forma logarítmica conforme apresentada na **Equação II.1.8**.

$$\log C_s (eq) = \log K_F + \frac{1}{n} \times \log C_{aq} (eq) \quad \text{Equação II.1.8}$$

O modelo de Freundlich (isoterma de Freundlich) pode resultar no modelo linear (isoterma linear) quando a constante $1/n$ do modelo de Freundlich se aproximar da unidade.

A maioria dos trabalhos existentes sobre o comportamento de antimicrobianos em solos é oriunda de países de clima temperado, sendo que as diferentes condições encontradas nos trópicos devem contribuir para que o comportamento destes compostos seja distinto no Brasil. Ainda pouco se conhece sobre a ocorrência e a dinâmica destes compostos, particularmente nos ambientes tropicais. Assim sendo, os estudos de adsorção e dessorção são fundamentais para fornecer informações sobre a mobilidade e a distribuição dos antimicrobianos no meio ambiente.

II.1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS EM MATRIZ SÓLIDA

A análise de fármacos veterinários de diferentes classes terapêuticas envolve o uso de uma variedade de técnicas. A garantia de qualidade que envolve cada passo do procedimento analítico, incluindo amostragem e estocagem, é essencial para a confiabilidade das determinações analíticas que se seguem.

No monitoramento de fármacos veterinários em amostras ambientais sólidas é importante considerar a heterogeneidade da matriz. Na determinação de fármacos veterinários neste tipo de matriz, em que o analito está presente em baixas concentrações e juntamente com um elevado número de compostos potencialmente interferentes, é essencial realizar um efetivo tratamento da amostra que, normalmente, inclui passos de extração e purificação (ou ambos) precedente a análise por cromatografia à gás ou, mais frequentemente, cromatografia à líquido.

A extração de fármacos veterinários de matrizes ambientais sólidas tem sido normalmente realizada por sonicação ou por agitação da amostra com solventes orgânicos polares ou misturas destes com soluções aquosas adequadas (Liguoro *et al.*, 2003; Días-Cruz *et al.*, 2003).

Outras técnicas de extração mais avançadas tem sido desenvolvidos, incluindo a extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*), extração com fluído supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid*

extraction), extração com líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*) para a remoção de fármacos veterinários em matrizes ambientais sólidas (Raich-Montiu *et al.*, 2010).

A limpeza dos extratos é geralmente realizada por extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*). Posteriormente, as fases obtidas podem ser separadas por centrifugação e concentradas por evaporação, sendo que a SPE tem sido preferida em muitos casos por ser rápida e requerer menor volume de solvente orgânico (Thiele-Bruhn, 2003).

A determinação de fármacos em extratos obtidos tem sido realizada preferencialmente por cromatografia à líquido do que cromatografia à gás, uma vez que muitos fármacos são polares e termolábeis. A separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) de fármacos tem sido realizada em colunas de fase reversa (C18) usando diferentes fases móveis (Días-Cruz *et al.*, 2003).

Deteção por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode-array detection*), UV, fluorescência e espectrometria de massas (MS, do inglês *mass-spectrometry*) ou espectrometria de massas em tandem (MS/MS) tem sido utilizadas como técnicas de detecção acopladas à cromatografia líquida para análise de fármacos veterinários em matrizes ambientais sólidas. Devido ao fato da espectrometria de massas em tandem (MS/MS) possuir baixo limite de detecção, alta seletividade e informar a respeito da estrutura dos compostos, o acoplamento desta técnica com a cromatografia à líquido na análise de amostras ambientais têm sido crescente. Contudo, por conta do alto custo da instrumentação, a detecção por arranjo de diodos e fluorescência ainda é comum (Días-Cruz *et al.*, 2003; Karci *et al.*, 2009; Aga e O`Connor, 2005).

II.1.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações.

Neste contexto, o ICH (ICH, 2005) elaborou um guia sobre validação de métodos que tem sido utilizado também em outras áreas de estudo que não apenas a farmacêutica. Na área de Química Ambiental, os métodos padrões para análise de contaminantes publicados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, 2007) contêm orientações a respeito da validação destes métodos.

A estimativa dos parâmetros analíticos de validação pode variar de acordo com a técnica analítica empregada ou com o protocolo de validação a ser seguido.

A validação dos métodos propostos neste trabalho para análise de sulfonamidas em soluções de solo foi realizada com base na Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e no Guia de Validação do MAPA (2011^o). A seguir são descritos os principais parâmetros de validação.

II.1.6.1. Efeito matriz e seletividade

Os estudos referentes ao efeito matriz são delineados com o preparo de curvas analíticas no solvente e curvas analíticas na matriz.

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada para garantir que o pico de resposta do analito seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra. A seletividade pode ser então, avaliada por meio da comparação entre cromatogramas de extratos branco da matriz e extratos branco da matriz fortificada com o analito. Este parâmetro pode ser avaliado também pela análise da pureza de pico que é verificada em três pontos (início, ápice e fim do pico) quando se é empregado métodos como cromatografia líquida com detecção por arranjos de fotodiodos. Além disso, os espectros de UV

obtidos nestes três pontos do pico devem ser comparados com o espectro do padrão do analito.

II.1.6.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade

Segundo a ANVISA (2003), a curva analítica representa a relação entre a resposta analítica e a concentração conhecida do analito. A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser mantida constante.

Ainda a ANVISA (2003) preconiza que a linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro da faixa linear da curva analítica. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Para expressar a linearidade do método é empregado o coeficiente de correlação (r) da curva analítica. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é $r > 0,99$.

Assim como no Capítulo I, a linearidade do método foi avaliada aplicando as três etapas estatísticas: 1) projeto experimental que consiste na determinação da faixa de interesse considerando que a concentração do analito na amostra deva estar próxima ao centro do intervalo da faixa; 2) o método dos mínimos quadrados ordinários incluindo a estimativa dos parâmetros e tratamento de *outliers* (avaliado pelo teste de Jackknife); 3) verificação das suposições relacionadas ao método dos mínimos quadrados ordinários e resíduos (teste para hipótese residuais é utilizado a homocedasticidade) (Souza & Junqueira, 2005).

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta varia em função da variação da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

II.1.6.3. Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção é determinado como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

A ANVISA (2003) sugere apenas que o LOD deve ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado, recomendando que o LOD seja três vezes superior ao ruído da linha de base. O limite de detecção também pode ser calculado conforme **Equação II.1.9.**

$$LOD = \frac{3s_{y/x}}{m} \qquad \text{Equação II.1.9}$$

onde, $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas e m é o coeficiente angular da curva analítica.

II.1.6.4. Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

A ANVISA (2003) cita que o limite de quantificação pode ser estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela **Equação II.1.10.**

$$LOQ = \frac{10s_{y/x}}{m}$$

Equação II.1.10

onde, $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas e m é o coeficiente angular da curva analítica.

II.1.6.5. Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre as várias medidas efetuadas na mesma amostra. A precisão pode ser estimada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-ensaio), precisão intermediária (precisão inter-ensaio) e reprodutibilidade. Para a validação de métodos em um único laboratório (single-laboratory validation), que é o enfoque neste trabalho, apenas os dois primeiros níveis são relevantes para este parâmetro.

A precisão intra-ensaio descreve as variações observadas durante análises em um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. E a precisão inter-ensaio descreve o grau de variações observadas em diferentes condições (mínimo de dois dias diferentes).

Usualmente, a precisão é expressa como a estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD) conforme **Equação II.1.11**.

$$RSD (\%) = \frac{s}{Média} \times 100$$

Equação II.1.11

II.2. OBJETIVOS

Neste capítulo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a mobilidade de fármacos veterinários do grupo das sulfonamidas (sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina) em solos tropicais característicos do Estado de São Paulo mediante estudos de adsorção e dessorção.

II.3. PARTE EXPERIMENTAL

II.3.1. Reagentes e Padrões

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau de pureza analítica e os solventes orgânicos de grau HPLC. A água empregada para o preparo de soluções foi purificada em um sistema Milli-Q – 18,2 M Ω cm (Millipore, EUA). As soluções e solventes foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 μ m, acoplados a sistema de filtração (Millipore, EUA).

Os padrões analíticos das sulfonamidas foram: sulfadiazina – SDZ (Sigma-Aldrich, 99%), sulfadimetoxina sódica – SDM (Sigma-Aldrich, 99%) e sulfaquinoxalina sódica – SQX (Sigma-Aldrich, 95%).

II.3.2. Materiais

Para a separação cromatográfica das sulfonamidas foi empregada uma coluna XBridge™ (Waters, EUA) de fase reversa de sílica híbrida com dimensões 150 x 4,6 mm e diâmetro de partículas de 3,5 μ m com sua respectiva coluna de guarda (XBridge™ 20 mm x 4,6 mm; 3,5 μ m).

II.3.3. Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência série 1200 (Agilent, EUA), equipado com sistema de bombeamento quaternário modelo G1311A, detector de arranjo de fotodiodos – DAD – modelo G1315D, forno para coluna modelo G1316A e injetor automático modelo G1329A. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa computacional ChemStation (Agilent, EUA).

Para a desgaseificação da fase móvel foi utilizado um banho de ultra-som modelo USC 700 (UNIQUE THORTON, Brasil).

Os padrões analíticos foram pesados em uma balança analítica Sartorius (Alemanha) modelo CPA 225D, com precisão de $\pm 0,01$ mg.

As amostras de solos foram pesadas em balança analítica Precisa (Suíça) modelo XT 220A, com precisão de $\pm 0,1$ mg.

Para medidas de pH foi utilizado um pH-metro modelo DM-22 e um eletrodo de vidro combinado (DIGIMED, Brasil).

Para os estudos de adsorção e dessorção foi usada uma mesa agitadora Marconi (Brasil) modelo MA 139/CFT.

A centrifugação das amostras foi realizada em centrífuga ventilada Hettich (Alemanha) modelo Rotofix 32A.

II.3.4. Amostras de solos tropicais característicos do Estado de São Paulo

Os estudos de adsorção e dessorção da sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina foram realizados em quatro solos característicos do Estado de São Paulo, denominados N1 (areia quartzosa – Neossolo Quartzarênico), N2 (Latosolo Vermelho Escuro – Latossolo vermelho), S1 (Latosolo Vermelho Amarelo – Latossolo Vermelho Amarelo) e S2 (Solo Podzólico Argiloso – Argissolo vermelho-amarelo).

De acordo com o triângulo textural (**Figura II.1.1**), os solos utilizados neste trabalho estão divididos nas seguintes classes texturais N1 (areia), N2 (argila), S1 (argiloarenosa) e S2 (argila).

As amostras de solo foram coletadas em 2005 de diferentes localizações e transferidas para lisímetros (1 x 1 x 2 m) localizados no campo experimental da Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna/SP.

A origem das amostras dos quatro tipos de solos foi:

- ✚ N1 – areia, cidade de Santa Rita do Passo Quatro, SP (latitude 21°42'18,12''S e longitude 47°28'04,82''W, altitude 773 metros) (área de pastagem).
- ✚ N2 – argila, cidade de Sertãozinho, SP (latitude 21°05'20,44''S e longitude 47°48'10,73W, altitude 538 metros) (área de plantio de cana de açúcar).
- ✚ S1 – argiloarenosa, cidade de Jaguariúna, SP (latitude 22°43'14,92''S e longitude 47°01'14,20''W, altitude 617 metros) (área de plantação de citrus).
- ✚ S2 – argila, cidade de Jaguariúna, SP (latitude 21°42'59,50''S e longitude 47°01'00,05''W, altitude 609 metros) (coberto de *Brachiaria*).

As amostras de solo utilizadas nos experimentos foram coletadas em julho de 2010 na parte superficial (0 – 20 cm) de cada um dos quatro lisímetros, secas ao ar, peneiradas com tamanho de partícula ≤ 2 mm e estocadas em temperatura ambiente até o momento dos estudos. As características físico-químicas de cada solo (**Tabela II.3.1**) foram determinadas previamente no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC - Centro de Solos e Recursos Ambientais – Laboratório de Fertilidade do Solo) e a análise granulométrica foi realizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Jaguariúna (EMBRAPA – Laboratório de Qualidade do Solo).

Tabela II.3. 1. Propriedades físico-químicas dos solos N1, N2, S1 e S2.

Propriedade		Unidade	N1	N2	S1	S2
pH (em 0,01 mol L ⁻¹) CaCl ₂		---	5	4,9	4,1	4,4
Matéria Orgânica (MO)		% (m/m)	1,53	2,88	2,48	3,23
Carbono Orgânico (CO)		% (m/m)	0,89	1,67	1,44	1,87
Textura	Areia	%	91,1	14,9	52,9	43,5
	Silte (0,053 – 0,002 mm)	%	1,8	30,2	10,5	7,0
	Argila (<0,002 mm)	%	6,2	54,6	36,2	49,2
P		mg kg ⁻¹	3	14	5	5
K		mmolc kg ⁻¹	0,5	0,5	1,1	0,7
Ca		mmolc kg ⁻¹	5	12	3	9
Mg		mmolc kg ⁻¹	2	6	2	6
H+Al		mmolc kg ⁻¹	11,8	34,2	45,8	50,3
S.B.		mmolc kg ⁻¹	7,5	18,5	6,1	15,7
C.T.C.		mmolc kg ⁻¹	19,3	52,7	51,9	66
V		%	38,9	35,1	11,8	23,8
B		mg kg ⁻¹	0,11	0,15	0,24	0,2
Cu		mg kg ⁻¹	<0,1	5,4	0,8	0,8
Fe		mg kg ⁻¹	14	9	29	42
Mn		mg kg ⁻¹	4,8	23,9	4	1,1
Zn		mg kg ⁻¹	0,3	0,4	0,8	1,4

mmolc: milimol de carga, H + Al: acidez total, SB: Ca + Mg + K + Na, C.T.C: capacidade de troca catiônica = SB + (H + Al), V%: porcentagem de CTC saturada por bases a pH 7, V% = 100/(SB/CTC).

II.3.5. Metodologia

II.3.5.1. Preparo de soluções

As soluções estoque da SDZ, SDM e SQX foram preparadas nas concentrações de $750 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, em água e mantidas sob refrigeração ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e ao abrigo de luz. As soluções de trabalho das respectivas sulfonamidas foram preparadas mediante diluição das soluções estoque em cloreto de cálcio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e mantidas ao abrigo de luz.

II.3.5.2. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em soluções de solo provenientes dos estudos de adsorção e dessorção

II.3.5.2.1. Desenvolvimento do método cromatográfico e parâmetros de conformidade do sistema

Como os estudos de sorção seriam realizados individualmente para cada sulfonamida, foram otimizados três métodos cromatográficos (HPLC-DAD) no sentido de garantir a seletividade do método, no entanto, sem comprometer o tempo de retenção da análise. A otimização foi conduzida no sentido de atender os requisitos necessários dos parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico: resolução ($R_s > 1,5$), número de pratos ($N > 2000$), fator de assimetria (A_s entre 0,8 e 1,4) e fator de retenção ($k > 2$).

A fase estacionária empregada foi de fase reversa (C_{18}) composta de sílica híbrida (XBridge™ 150 mm x 4,6 mm; $3,5 \mu\text{m}$) com sua respectiva coluna de guarda

(XBridge™ 20 mm x 4,6 mm; 3,5 µm). Como fase móvel foi empregada uma mistura de metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico como fase orgânica (FO) e uma solução de 0,1% (v/v) ácido fórmico como fase aquosa (FA). O modo de eluição foi isocrático e a detecção das sulfonamidas foi realizada nos comprimentos de onda de máxima absorvância para cada uma das sulfonamidas.

II.3.5.2.2. Parâmetros de validação

A validação do método proposto foi realizada de acordo com a avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão (intra- e inter-ensaio), limite de detecção e limite de quantificação. A linearidade e a faixa linear da SDZ, SDM e SQX foram estabelecidas por meio da curva analítica, em triplicata, para seis níveis de concentração.

O efeito matriz foi avaliado, em triplicata, para todos os solos em estudo mediante fortificação (10 µg mL⁻¹ de SDZ, SDM e SQX, separadamente) da solução branca de solo pré-equilibrada por 12 horas com 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂. O extrato fortificado foi analisado por HPLC-DAD e a área obtida comparada estatisticamente com a área da solução das respectivas sulfonamidas em 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂ no mesmo nível de concentração. A seletividade do método foi avaliada mediante análise de solução branca de solo pré-equilibrada por 12 horas com 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂.

A seletividade e o efeito matriz foram avaliados pela análise dos cromatogramas obtidos para solução branca de solo fortificada e solução branca de solo quanto à pureza do pico cromatográfico e eluições de compostos próximos aos tempos de retenção das sulfonamidas em estudo.

A precisão intra-ensaio foi avaliada nas mesmas condições empregadas no estudo de adsorção (razão solo/solução de 1:1 m/v para SDZ, 1:2 m/v para SDM e 1:5 m/v para SQX). Para tanto, uma massa equivalente a 2 g (ou 1 g) de amostras brancas de solo foram deixadas por 12 horas em contato, sob agitação, com uma solução de 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂ e, posteriormente, fortificadas com soluções das

sulfonamidas ($10 \mu\text{g g}^{-1}$ para a SDZ, $20 \mu\text{g g}^{-1}$ para SDM e $50 \mu\text{g g}^{-1}$ para SQX). As misturas de soluções de solo fortificadas foram agitadas por um período de 48 horas e as soluções separadas do solo conforme descrito no item II.3.5.3.2 foram analisadas em 6 replicatas por HPLC-DAD, no mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. A precisão inter-ensaio foi avaliada para o mesmo nível de concentração explicitado para a precisão intra-ensaio, sendo que a análise foi repetida em mais dois dias diferentes, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. As precisões intra- e inter-ensaio foram expressas pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

O limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados como 3 e 10 vezes a razão sinal-ruído, respectivamente, usando concentrações decrescentes das sulfonamidas em solução branco de solo (para os quatro solos).

II.3.5.3. Estudo da adsorção e dessorção de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em amostras de solos tropicais característicos do Estado de São Paulo

Os experimentos de adsorção e dessorção de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em quatro solos de diferentes características (N1, N2, S1 e S2) do Estado de São Paulo foram realizados com base no Guia 106 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês *Organization for Economic Co-operation and Development*, 2000).

II.3.5.3.1. Estudos preliminares: Otimização das condições a serem empregadas nos estudos de adsorção e dessorção das sulfonamidas em solos

Anterior aos estudos de adsorção com os quatro solos foi avaliada a possibilidade de adsorção da sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina nos frascos empregados, bem como a estabilidade em solução durante o período de estudo.

Em seguida, foram avaliadas três razões solo:solução (1:1, 1:2 e 1:5 m/v) para selecionar a melhor razão, uma vez que a adsorção deve estar acima de 20% e, preferencialmente, em torno de 50% (OECD, 2000).

Após selecionar a razão solo:solução foi avaliado o tempo necessário para o sistema alcançar o equilíbrio. Para tanto, o tempo de equilíbrio de cada solo:solução foi estabelecido por meio de um gráfico porcentagem de adsorção contra o tempo.

II.3.5.3.2. Estudos de adsorção e dessorção

Conforme as determinações do Guia 106 da OECD, o procedimento para o estudo de adsorção das sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) envolveu os seguintes passos: A) equilíbrio das amostras de solo com solução de $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ em uma mesa agitadora (150 rpm) por um período de 12 horas; B) Adição de um volume apropriado (não mais do que 10% do volume total) da solução das sulfonamidas, em estudos separados, preparadas em $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ para ajustar o volume final equivalente a razão solo:solução selecionada. As amostras foram horizontalmente agitadas pelo tempo de equilíbrio selecionado, no escuro, a temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). As suspensões foram centrifugadas (15 minutos, 4186 g) e o sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Millex), para, em seguida, serem analisados por HPLC-DAD. A concentração de cada sulfonamida adsorvida no solo ($C_s^{\text{ads}}/\text{g } \mu\text{g}^{-1}$) foi calculada conforme a **Equação II.3.1**:

$$C_s^{ads} = \frac{V_0}{m_{solo}} \times (C_0 - C_{aq}^{ads})$$

Equação II.3.1

em que, V_0 é o volume da solução inicial (mL), m_{solo} é a massa do solo (g), C_0 é a concentração inicial ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e C_{aq}^{ads} é a concentração remanescente em solução depois do equilíbrio ter sido atingido ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Assim sendo, um gráfico de C_s^{ads} versus C_{aq}^{ads} , no equilíbrio, foi plotado a fim de se obter as constantes K_D e K_{CO} (coeficiente de distribuição e coeficiente normalizado pelo carbono orgânico, respectivamente).

Seguindo o mesmo protocolo, foi realizado o estudo de dessorção das sulfonamidas do mesmo modo que os experimentos de adsorção foram realizados. Sendo assim, o solo remanescente do estudo de adsorção é utilizado para os estudos de dessorção. Ao solo foi adicionado um volume equivalente ao selecionado na razão solo:solução de $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ e os tubos foram agitados horizontalmente (150 rpm) pelo tempo de equilíbrio selecionado, no escuro, a temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). As suspensões foram centrifugadas (15 minutos, 4186 g) e o sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa de $0,22 \mu\text{m}$ (Millex), para, em seguida, serem analisados por HPLC-DAD. Da mesma forma, um gráfico de C_s^{des} versus C_{aq}^{des} , no equilíbrio, foi plotado a fim de se obter os coeficientes de dessorção.

Amostras controle (soluções das sulfonamidas em $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$), assim como amostras solução branca de solo também foram analisadas.

II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1. Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a quantificação de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em soluções de solo provenientes dos estudos de adsorção e dessorção

Para a separação cromatográfica das sulfonamidas foi selecionada a mesma fase estacionária utilizada no método desenvolvido para medicamentos veterinários (XBridge™ RP-18, 150 x 4,6 mm, 3,5 µm) e a mesma fase móvel (metanol com a adição de 0,1% de ácido fórmico e solução de 0,1% de ácido fórmico). O volume de injeção foi de 20 µL, a temperatura foi controlada com forno a 40 °C e a detecção foi realizada no comprimento de onda de máxima absorvância de cada sulfonamida. Estas condições foram estabelecidas para as três sulfonamidas, porém foram desenvolvidos dois métodos, sendo um para a separação e quantificação da sulfadiazina e o outro para a separação e quantificação da sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em soluções de solo. No método que permitiu a separação das três sulfonamidas em uma mesma corrida cromatográfica (apresentado no Capítulo I), a SDZ apresentava um tempo de retenção de 5,1 minutos e haveria coeluição de interferentes da matriz. Cabe ressaltar que nas soluções de solo ocorre eluição de um número elevado de compostos mais polares do que as sulfonamidas nos primeiros 6 minutos, o que direcionou o estabelecimento das condições para que a primeira sulfonamida eluisse por volta de 8 minutos. Sendo assim, se a condição cromatográfica fosse ajustada para aumentar o tempo de retenção da SDZ levaria também a um aumento no tempo de retenção das outras duas sulfonamidas, o que levaria a um maior tempo de análise. Uma vez que nos estudos de sorção as sulfonamidas seriam avaliadas individualmente, foram empregados dois métodos que permitissem diminuir o tempo de análise, no entanto, sem comprometer a seletividade do mesmo.

Para a determinação de SDZ em soluções de solo, o modo de eluição foi isocrático, sendo 10% (v/v) de fase orgânica e 90% (v/v) de fase aquosa (mantendo, assim, a proporção inicial do método anteriormente descrito no Capítulo I), e a vazão da fase móvel foi de 0,7 mL min⁻¹. Para a determinação de SDM e SQX em soluções de solo, o modo de eluição foi isocrático, sendo 30% (v/v) de fase orgânica e 70% (v/v) de fase aquosa e a vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹. Nestas duas condições de estudo, a SDZ, SDM e SQX possuem tempos de retenção de 8,6 minutos, 10,6 minutos e 12,7 minutos, respectivamente. A **Tabela II.4.1** apresenta os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para as condições otimizadas. Com estas condições foi obtida simetria adequada do pico cromatográfico de SDZ, SDM e SQX com tempo de retenção relativamente curto, além de estar de acordo com os critérios previamente estabelecidos (N>2000, Res >1,5, fator de assimetria entre 0,8 e 1,4 e k >2,0).

Tabela II.4. 1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para as sulfonamidas (SA): SDZ, SDM e SQX.

SA	Parâmetros de conformidade				
	t _R	N	Rs	As	k
SDZ	8,60	12423	-	0,80	3,15
SDM	10,6	7618	-	0,90	6,70
SQX	12,7	7421	3,98*	1,02	8,25

*Rs obtida a partir do pico cromatográfico antecedente (SDM).

Portanto, as condições cromatográficas otimizadas são adequadas para a determinação de sulfadiazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina em soluções de solo.

II.4.2. Estudo de adsorção/dessorção das sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) em solos do Estado de São Paulo

As sulfonamidas são moderadamente solúveis em água. Elas são caracterizadas por dois valores de pKa indicando protonação do grupo amino em $\text{pH} < \text{pK}_{a1}$ e desprotonação do grupo RSO_2NHR_1 em $\text{pH} > \text{pK}_{a2}$. Comumente, as sulfonamidas anfotéricas se comportam como ácidos orgânicos fracos e formam sais em soluções fortemente ácidas ou básicas.

O comportamento dos fármacos veterinários, quando liberados no ambiente, é determinado pelas propriedades físico-químicas, assim como a estrutura, tamanho, forma, solubilidade, hidrofobicidade e especiação. Além disso, o comportamento de sorção destes fármacos também pode variar muito em diferentes tipos de solo, uma vez que as propriedades destes também influenciam no comportamento de sorção, assim como conteúdo de matéria orgânica, textura, mineralogia, conteúdo de argila, pH, força iônica, capacidade de troca catiônica, além das condições climáticas locais (Sarmah *et al.*, 2006). O grau em que um fármaco veterinário pode adsorver nas partículas dos solos varia amplamente, assim como sua mobilidade no solo. Os estudos de adsorção e dessorção são adequados para avaliar a mobilidade dos fármacos veterinários nos solos e em outros meios como água e ar.

II.4.2.1. Estudos preliminares

Anterior aos estudos de adsorção e dessorção com os solos foi avaliada a possibilidade de adsorção das sulfonamidas nos frascos empregados, bem como a estabilidade em solução. Para isso, amostras controle da SDZ, SDM e SQX à concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram agitadas horizontalmente (150 rpm) por um período de 56 horas e analisadas por HPLC-DAD. O presente estudo revelou que a SDZ e a SDM são estáveis no tempo requerido para o estudo e que não há adsorção da mesma pelo material dos tubos de centrífuga (polipropileno). Porém, foi verificada adsorção de 25% da SQX neste material. Estudos comparativos com frascos de vidro e soluções recém-preparadas (controle) foram utilizados para certificar que não

houve degradação da sulfaquinoxalina no tempo do ensaio (48 horas), na ausência de luz (frascos cobertos com folhas de alumínio durante todo o ensaio). Dessa forma, foram empregados tubos de vidro nos estudos de adsorção/dessorção da SQX uma vez que não houve adsorção ou degradação da SQX neste material durante o período de tempo estudado.

Em seguida, foram avaliadas três razões solo:solução (1:1, 1:2 e 1:5 m/v) para selecionar a melhor razão para realizar os estudos de adsorção e dessorção. A razão solo:solução apropriada foi selecionada de modo que a porcentagem de adsorção estivesse acima de 20% e preferencialmente em torno de 50%. Portanto, para os quatro tipos de solo analisados (N1, N2, S1 e S2) a razão solo:solução mais adequada foi de 1:1 m/v para a SDZ, 1:2 m/v para a SDM e de 1:5 m/v para a SQX.

O tempo de equilíbrio aparente de cada sistema solo:solução foi estabelecido avaliando a porcentagem de adsorção de cada sulfonamida contra o tempo, sendo o período estudado de 24 a 56 horas.

O equilíbrio aparente estabelecido para SDZ, SDM e SQX nos quatro solos avaliados estão apresentados na **Figura II.4.1**.

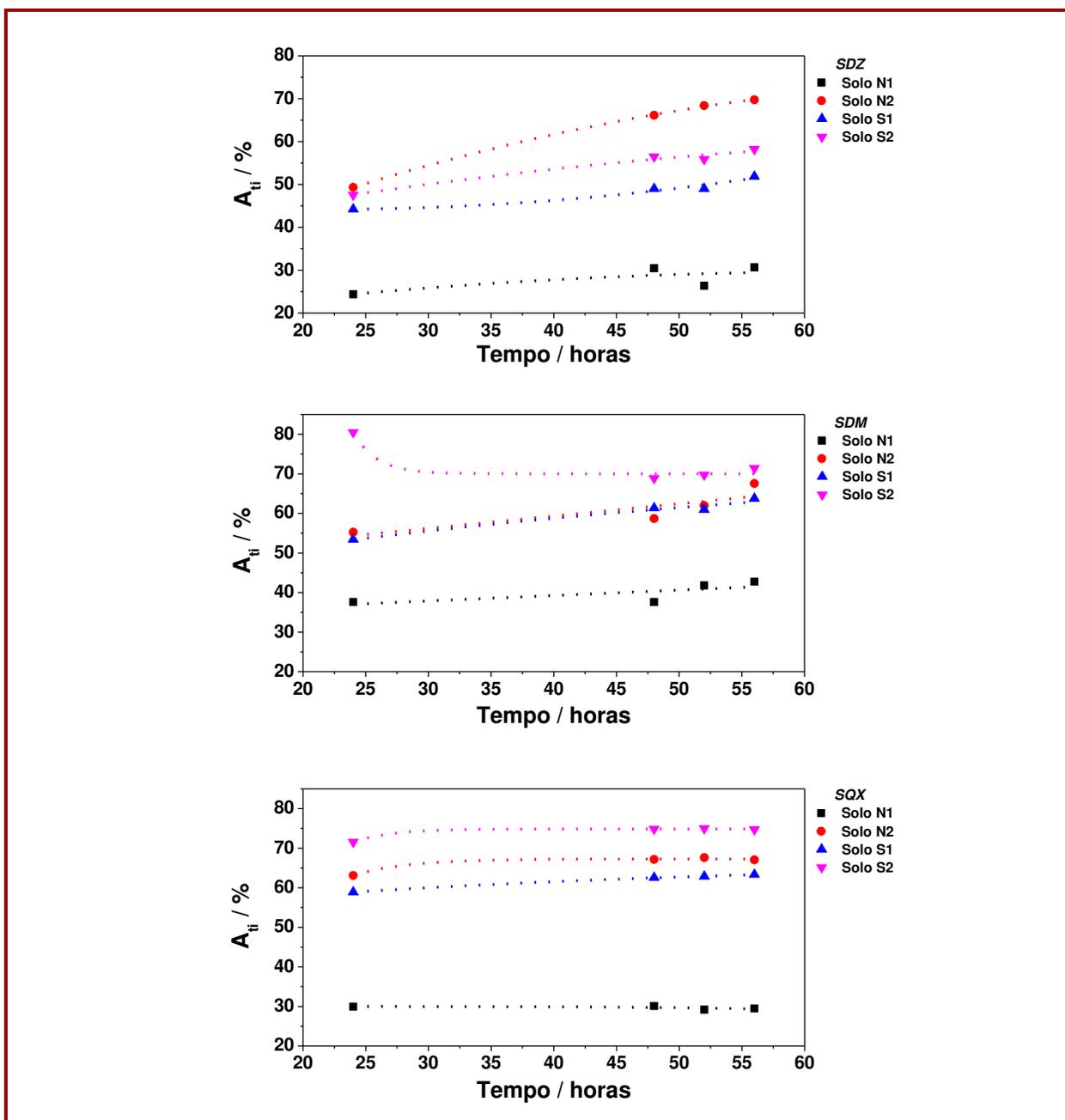


Figura II.4. 1. Tempo de equilíbrio aparente da SDZ, SDM e SQX nos solos N1, N2, S1 e S2.

A quantidade de sulfonamidas adsorvidas nos quatro tipos de solo fortificados com $10 \mu\text{g g}^{-1}$ para SDZ, $20 \mu\text{g g}^{-1}$ para SDM e $25 \mu\text{g g}^{-1}$ para SQX mostrou que a adsorção aumenta com o tempo de contato solo-solução. O equilíbrio aparente selecionado para SDZ, SDM e SQX foi de 48 horas para os quatro solos estudados.

II.4.2.2. Validação do método

Com as condições otimizadas da razão solo-solução e tempo de equilíbrio, o método HPLC-DAD foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, precisão intra- e inter-ensaio, seletividade, efeito matriz, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). A validação do método teve como objetivo garantir a confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios de adsorção/dessorção e, portanto, todos os ensaios foram realizados simulando o estudo em si, ou seja, com a solução de solo.

A seletividade do método e efeito matriz foi avaliada pela análise dos cromatogramas obtidos de soluções branco de solo (N1, N2, S1 e S2) e soluções branco de solo fortificadas com SDZ, SDM e SQX, individualmente.

A **Figura II.4.2** apresenta cromatogramas característicos obtidos na análise de solução branco de solo (N1, N2, S1 e S2), assim como da SDZ, SDM e SQX de em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 à concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

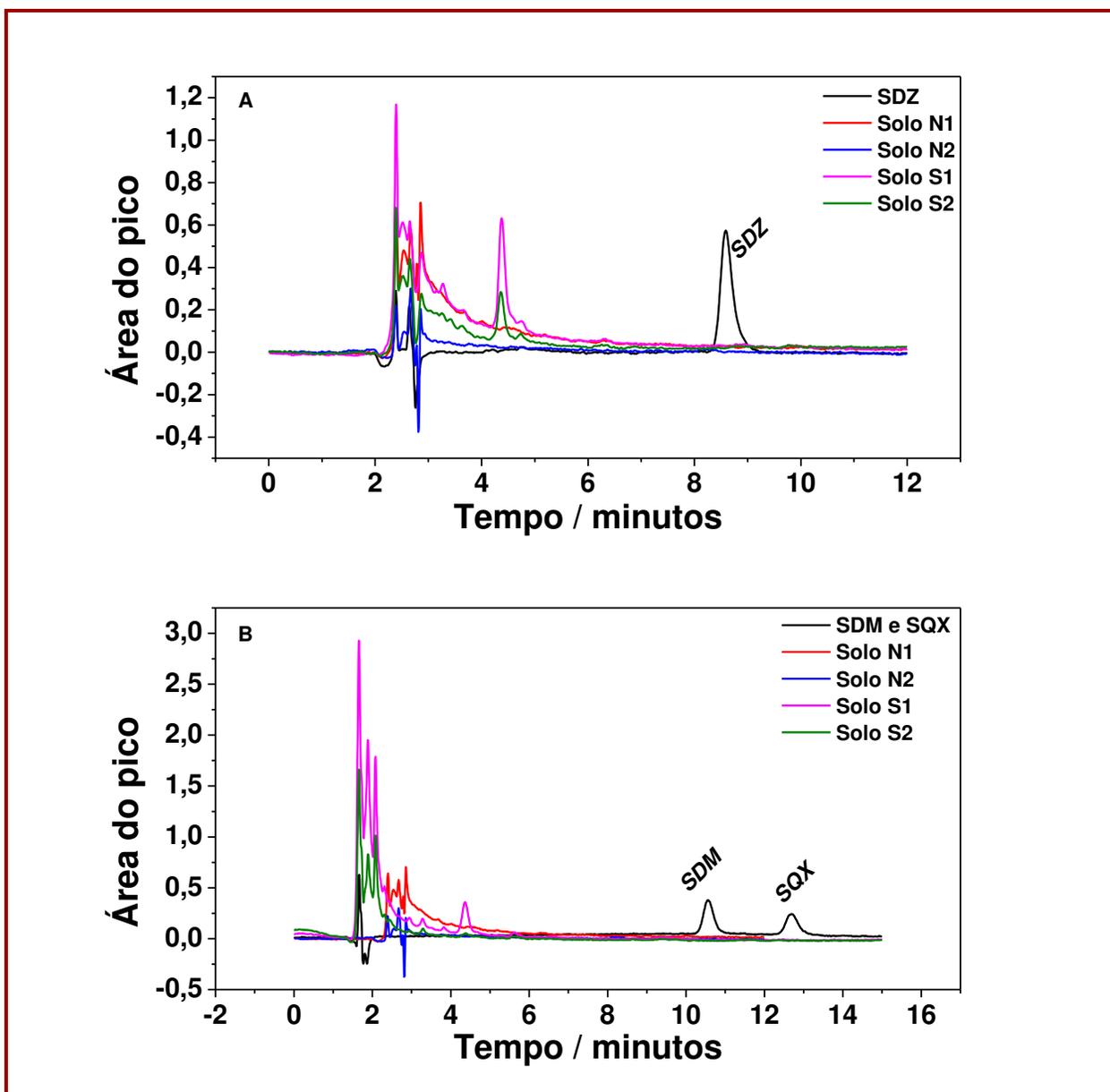


Figura II.4. 2. (A) Cromatogramas característicos da sulfadiazina (SDZ), matriz solo N1, N2, S1 e S2 (razão 1:1) com eluição isocrática: FO:FA 10:90 (v/v), vazão 0,7 mL min⁻¹; (B) sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQX), matriz solo N1, N2, S1 e S2 (razão 1:2) com eluição isocrática na proporção FO:FA 30:70 (v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹. A concentração das três sulfonamidas foi mantida em 0,1 µg mL⁻¹. Condições cromatográficas: FE: XBridge, Fase móvel: FO (0,1% (v/v) de ácido fórmico em MeOH, FA 0,1% (v/v) de ácido fórmico, pH 3,0). Volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna 40 °C.

Não houve diferença significativa entre as áreas obtidas com as sulfonamidas em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 e as soluções branco de solo fortificadas a um nível de 95% de confiança. A pureza de pico foi avaliada em três pontos do pico cromatográfico (início, ápice e fim) com a finalidade de garantir que não houve coeluição de impurezas ou outros compostos da matriz solo. Os resultados não evidenciaram interferência da matriz (quatro tipos de solo) sob as condições experimentais estabelecidas para a SDZ e SDM. Porém, para a SQX houve interferência da matriz uma vez que houve supressão do sinal analítico. Sendo assim, para os estudos posteriores as curvas analíticas para SDZ e SDM foram preparadas no solvente ($0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$), e as para SQX foram preparadas em soluções branco de solo (para cada solo).

A linearidade e a sensibilidade foram obtidas a partir das curvas analíticas das sulfonamidas (SDZ e SDM) em $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, para seis níveis de concentração no intervalo de $0,05 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo para a SQX em soluções de solo para seis níveis de concentração no intervalo de $0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas em triplicatas independentes.

Os parâmetros de regressão linear da equação da reta para as três sulfonamidas estão resumidos na **Tabela II.4.2**. Ressaltando que a linearidade e a sensibilidade da SQX nos quatro tipos de solo foram semelhantes. A sensibilidade do método é expressa pelo coeficiente angular e a linearidade pelos coeficientes de correlação linear (r) das curvas obtidas a partir do método dos mínimos quadrados ordinários. O limite de detecção (LOD) e quantificação foram determinados como 3 e 10 vezes a razão sinal-ruído, respectivamente (**Tabela II.4.2**). Lembrando que o LOD e LOQ foram obtidos pela concentração decrescente das sulfonamidas em soluções branco de solo.

Tabela II.4. 2. Parâmetros de validação dos métodos de determinação de sulfonamidas em soluções de solo por HPLC-DAD.

Parâmetros de validação (HPLC-DAD)	Sulfonamidas		
	SDZ	SDM	SQX
Faixa Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,05 – 10	0,05 – 10	0,1 – 10
Linearidade (r)	0,9997	0,9999	0,9962
Sensibilidade (u.a./ $\mu\text{g mL}^{-1}$)	107	63,7	69,1
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,008	0,01	0,03
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,03	0,04	0,1

LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação; u.a.: unidade de absorvância.

A precisão intra-ensaio foi avaliada em um mesmo dia pela análise de seis amostras de solução de solo fortificada ($n = 6$) das sulfonamidas em um único nível de concentração, sendo $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de SDZ, $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de SDM e $25 \mu\text{g g}^{-1}$ de SQX em solo, conforme descrito no item II.3.5.2.2. A precisão inter-ensaio foi avaliada para o mesmo nível de concentração em três dias diferentes ($n = 12$). A precisão intra- e inter-ensaio foram expressas como estimativas dos desvios padrões relativos (RSD) e levou em consideração a concentração das sulfonamidas em solução na etapa de adsorção. Cabe mencionar que as concentrações das sulfonamidas remanescentes na solução de solo para os quatro tipos de solo foram aproximadamente entre 2,5 a $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerando que o nível de fortificação das sulfonamidas em cada solo foi de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de SDZ, $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de SDM e $25 \mu\text{g g}^{-1}$ de SQX. Os resultados da precisão estão resumidos na **Tabela II.4.3**.

Tabela II.4. 3. Precisão do método para SDZ, SDM e SQX nos solos em estudo na etapa de adsorção.

Sulfonamidas	Solo	Precisão (RSD %)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio
Sulfadiazina (SDZ)	N1	2,7	3,3
	N2	2,0	9,9
	S1	1,7	8,9
	S2	2,1	10,7
Sulfadimetoxina (SDM)	N1	7,5	6,4
	N2	2,8	4,7
	S1	2,1	2,8
	S2	2,9	3,7
Sulfaquinoxalina (SQX)	N1	2,0	11,1
	N2	3,0	11,4
	S1	1,1	5,0
	S2	5,2	6,0

II.4.2.3. Isotermas de adsorção e dessorção da SDZ, SDM e SQX nos solos N1, N2, S1 e S2

Isotermas foram construídas para todos os solos em estudo e diferentes modelos foram empregados para averiguar o melhor ajuste. O modelo adotado foi o que apresentou o melhor coeficiente de correlação (r). Neste estudo, o modelo de Freundlich foi adotado para a SDZ, SDM e SQX nos diferentes solos estudados. O modelo de Freundlich já foi apresentado na **Equação II.1.7** e a forma linearizada na **Equação II.1.8**.

Assim sendo, foram construídos gráficos de concentração de equilíbrio (C_{aq}^{ads} ; concentração remanescente em solução na etapa de adsorção) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ por

quantidade de SDZ, SDM e SQX adsorvida (C_s^{ads} ; concentração no solo na etapa de adsorção) em $\mu\text{g g}^{-1}$ de acordo com as **Equações II.1.7 e II.1.8**.

A **Figura II.4.3 e Figura II.4.4** mostram as isotermas de Freundlich para SDZ nos solos N1 e N2, S1 e S2, respectivamente

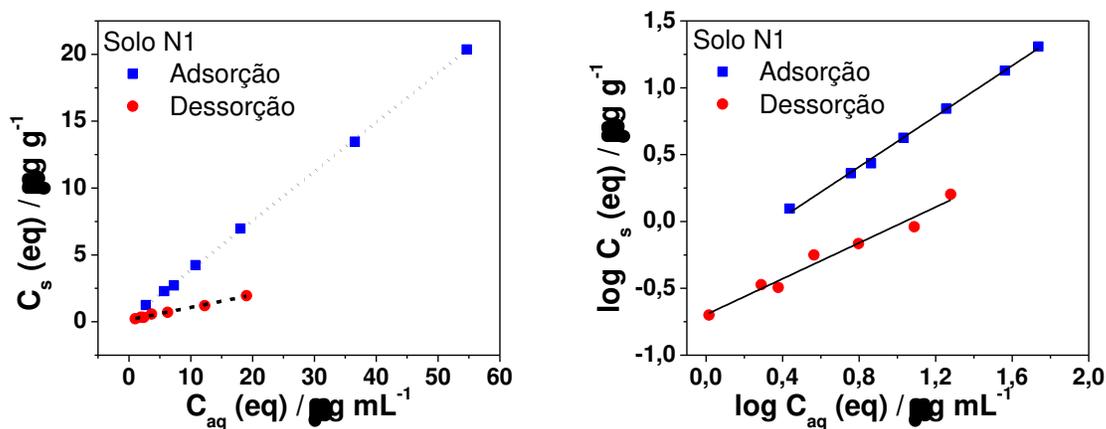


Figura II.4. 3. Isotermas de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDZ no solo com alto teor de areia (N1).

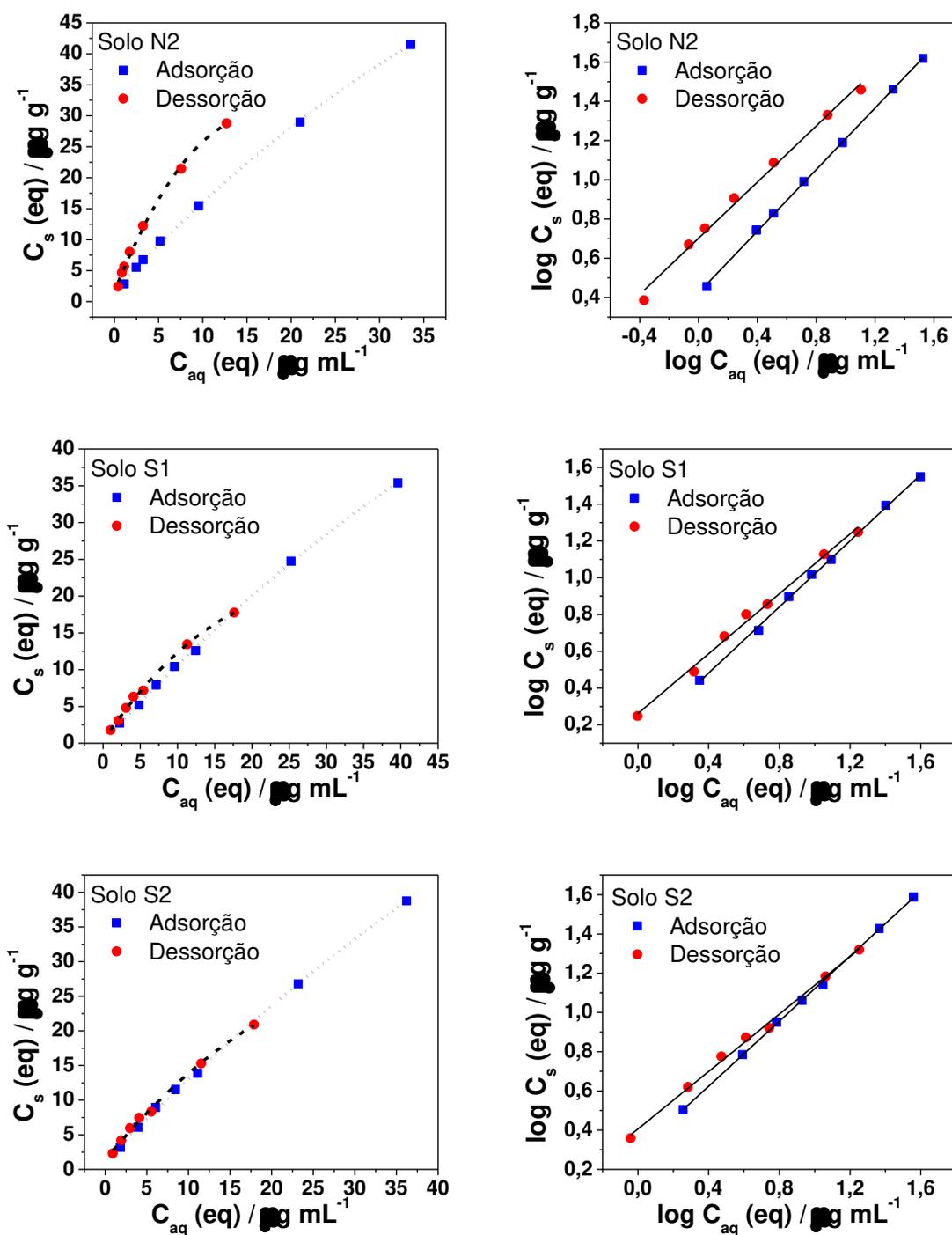


Figura II.4. 4. Isothermas de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDZ nos solos com alto teor de argila (N2, S1 e S2).

As isotermas de Freundlich obtidas neste trabalho corroboram os resultados obtidos por Calvet (1989) que sugerem uma diminuição na tendência de sorção das sulfonamidas com o aumento da concentração de equilíbrio. Esse fato pode ser explicado pela saturação dos sítios de adsorção do solo com o aumento da concentração das sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) em fase aquosa, ou seja, existe uma interação das moléculas de sulfonamidas com sítios do solo, como observado também por Kurwadkar *et al.* (2007).

A **Figura II.4.5** e **Figura II.4.6** mostram as isotermas de Freundlich para SDM nos solos N1 e N2, S1 e S2, respectivamente.

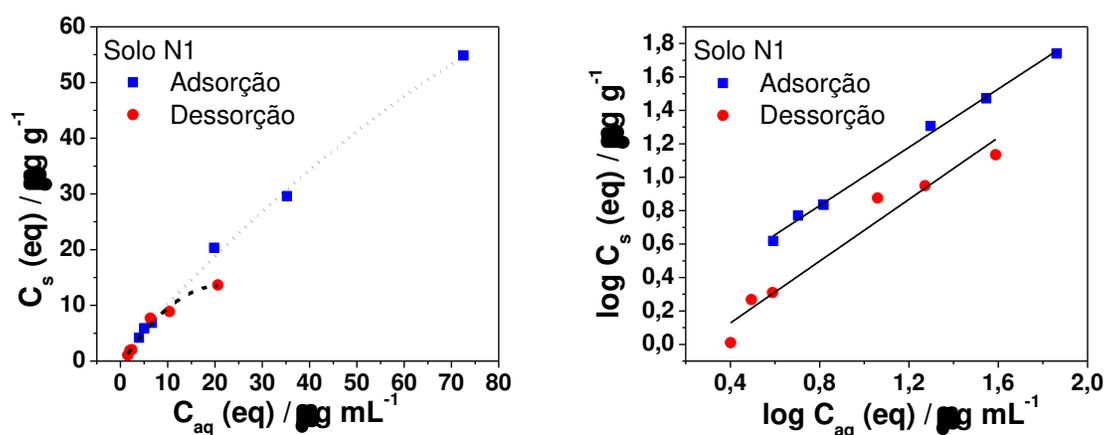


Figura II.4. 5. Isotherma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDM no solo com maior teor de areia (N1).

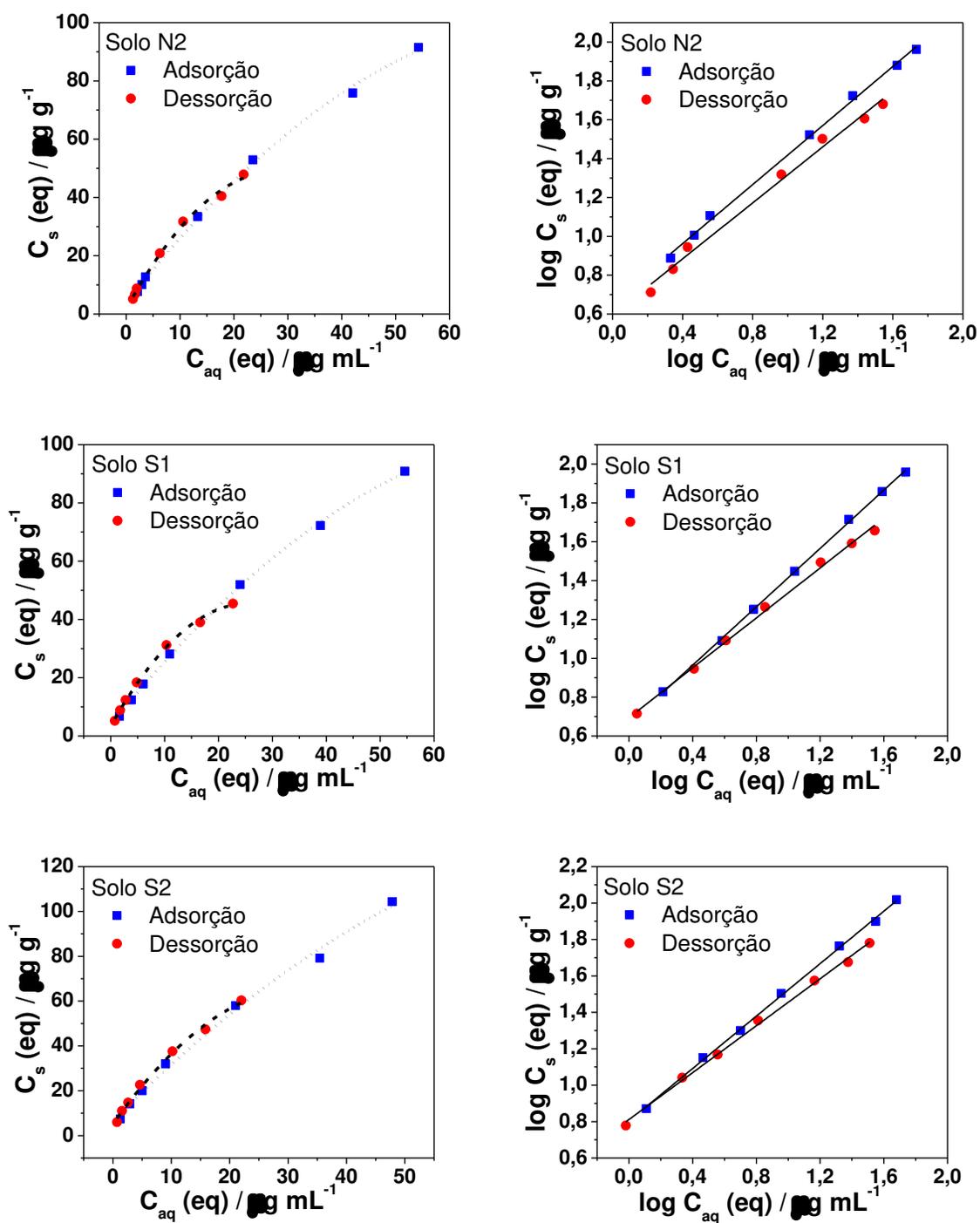


Figura II.4. 6. Isotherma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SDM nos solos com maior teor de argila (N2, S1 e S2).

A **Figura II.4.7** e **Figura II.4.8** mostram as isotermas de Freundlich para SQX nos solos N2, S1 e S2 e N1, respectivamente.

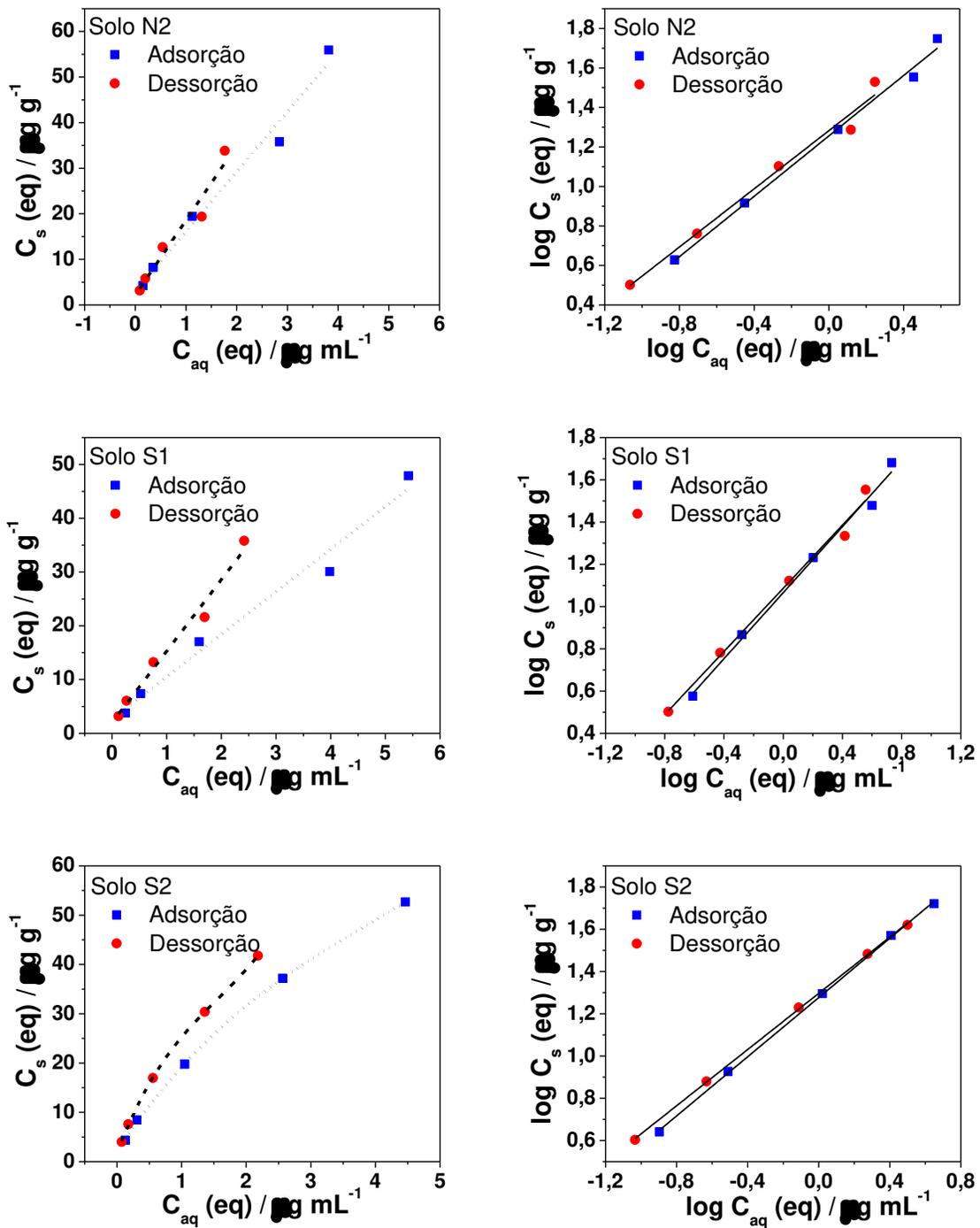


Figura II.4. 7. Isoterma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SQX nos solos com maior teor de argila (N2, S1 e S2).

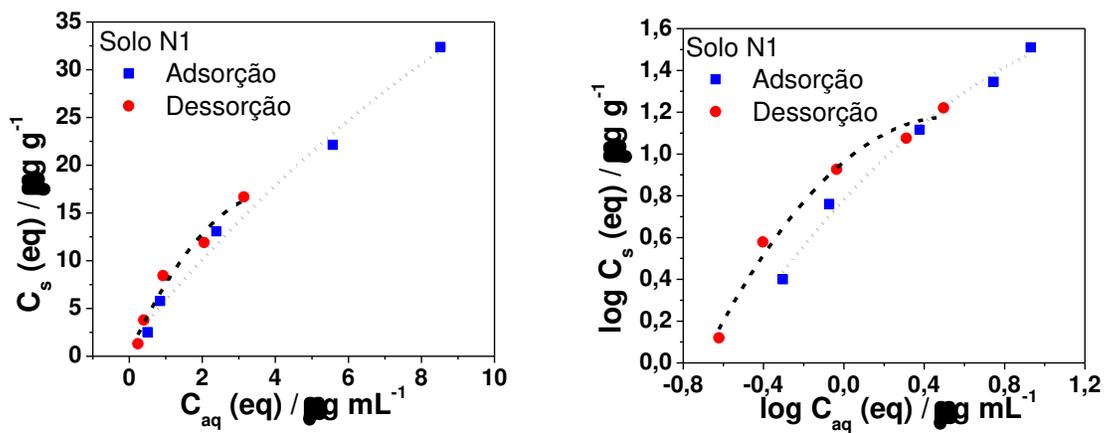


Figura II.4. 8. Isoterma de adsorção e dessorção de Freundlich na forma linear (esquerda) e logarítmica (direita) da SQX no solo com maior teor de areia (N1).

Os valores do coeficiente de adsorção e dessorção de Freundlich (K_F) e a inclinação $1/n$ (fator de heterogeneidade do sítio de energia ou fator de linearidade - é uma constante que descreve a intensidade de sorção) foram determinados pela forma logarítmica da isoterma de Freundlich e estão listados na **Tabela II.4.4** (SDZ), na **Tabela II.4.5** (SDM) e na **Tabela II.4.6** (SQX) para os quatro tipos de solo avaliados.

Tabela II.4. 4. Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich (K_F e $1/n$), coeficiente de distribuição (K_D), coeficiente de correlação (r), coeficiente normalizado pelo carbono orgânico (K_{CO}) e histerese para a SDZ nos quatro diferentes solos.

Solo	Estudo	Forma linear		Freundlich			H	K_{CO} ($cm^3 g^{-1}$)
		K_D ($cm^3 g^{-1}$)	r	K_F ($\mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}g^{-1}$)	$1/n$	r		
N1	Ad ^a	0,37	0,999	0,45	0,94	0,999	0,71	41
	Des ^b	0,09	0,996	0,20	0,67	0,984		-
N2	Ad ^a	1,2	0,997	2,6	0,78	0,999	0,92	71
	Des ^b	2,1	0,985	5,0	0,73	0,996		-
S1	Ad ^a	0,88	0,998	1,3	0,89	0,999	0,91	61
	Des ^b	0,96	0,992	1,8	0,81	0,997		-
S2	Ad ^a	1,0	0,998	2,0	0,83	0,999	0,88	55
	Des ^b	1,1	0,998	2,5	0,73	0,999		-

^a Ad: Adsorção; ^b Des: Dessorção.

A **Tabela II.4.4** apresenta os valores de K_F (adsorção) para os diferentes tipos de solo na faixa de $0,45 - 2,6 \mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}g^{-1}$, indicando mínima e máxima adsorção de SDZ no solo N1 e N2, respectivamente. De acordo com as propriedades físico-químicas dos solos, foi verificado que a adsorção de SDZ é favorecida em solos com maior teor de argila e matéria orgânica ($N2 > S2 > S1$) do que em solo arenoso (N1). No pH de estudo a SDZ se encontra, majoritariamente, na sua forma neutra e, portanto, a sorção pode ser explicada pelo fenômeno de partição com a matéria orgânica.

Tabela II.4. 5. Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich (K_F e $1/n$), coeficiente de distribuição (K_D), coeficiente de correlação (r), coeficiente normalizado pelo carbono orgânico (K_{CO}) e histerese para a SDM nos quatro diferentes solos.

Solo	Estudo	Forma linear		Freundlich			H	K_{CO} ($cm^3 g^{-1}$)
		K_D ($cm^3 g^{-1}$)	r	K_F ($\mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}g^{-1}$)	$1/n$	r		
N1	Ad ^a	0,73	0,996	1,4	0,87	0,998	1,1	82
	Des ^b	0,66	0,961	0,85	0,99	0,978		-
N2	Ad ^a	1,6	0,992	4,6	0,76	0,999	1,0	96
	Des ^b	2,0	0,986	4,7	0,77	0,996		-
S1	Ad ^a	1,6	0,994	4,6	0,75	0,999	0,87	110
	Des ^b	1,8	0,980	6,3	0,65	0,998		-
S2	Ad ^a	2,0	0,995	6,4	0,72	0,999	0,92	107
	Des ^b	2,5	0,990	7,8	0,66	0,999		-

^a Ad: Adsorção; ^b Des: Dessorção.

A **Tabela II.4.5** apresenta os valores de K_F (adsorção) para os diferentes tipos de solo na faixa de 1,4 – 6,4 $\mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}g^{-1}$, indicando mínima e máxima adsorção de SDM nos solos N1 e S2, respectivamente. A adsorção da SDM foi maior em solos com alto teor de argila e matéria orgânica (S2 > S1 > N2) do que no solo arenoso (N1). No pH de estudo a SDM se encontra, majoritariamente, na sua forma neutra e, portanto, a sorção pode ser explicada pelo fenômeno de partição com a matéria orgânica.

Tabela II.4. 6. Valores obtidos para os coeficientes de Freundlich (K_F e $1/n$), coeficiente de distribuição (K_D), coeficiente de correlação (r), coeficiente normalizado pelo carbono orgânico (K_{CO}) e histerese para a SQX nos quatro diferentes solos.

Solo	Estudo	Forma linear		Freundlich			H	K_{CO} ($cm^3 g^{-1}$)
		K_D ($cm^3 g^{-1}$)	r	K_F ($\mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}g^{-1}$)	$1/n$	r		
N1	Ad ^a	3,6	0,994	5,5	0,85	0,989	1,1	400
	Des ^b	5,0	0,975	6,8	0,90	0,969		
N2	Ad ^a	13,1	0,990	18,0	0,76	0,997	1,0	787
	Des ^b	23,9	0,988	27,0	0,80	0,996		
S1	Ad ^a	8,0	0,990	12,0	0,78	0,997	0,98	549
	Des ^b	13,3	0,991	17,0	0,77	0,995		
S2	Ad ^a	11,0	0,991	19,0	0,70	0,999	0,97	590
	Des ^b	18,0	0,993	24,8	0,68	0,999		

^a Ad: Adsorção; ^b Des: Dessorção.

A **Tabela II.4.6** apresenta os valores de K_F (adsorção) para os diferentes tipos de solo na faixa de $5,5 - 19,0 \mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}g^{-1}$, indicando mínima e máxima adsorção de SQX nos solos N1 e S2, respectivamente. A adsorção da SQX foi maior em solos com alto teor de argila e matéria orgânica ($S2 > N2 > S1$) do que no solo arenoso (N1). No pH de estudo a SQX se encontra na sua forma neutra e, portanto, a adsorção pode ser explicada pelo fenômeno de partição com a matéria orgânica. Estes resultados confirmam, também, a tendência de sulfonamidas serem preferencialmente retidas por partículas de textura fina (Thiele-Bruhn *et al.*, 2004).

Os coeficientes de distribuição (K_D) experimental foram calculados para SDZ, SDM e SQX pela **Equação II.1.3** (parte linear da isoterma). Os valores de K_D bem como K_F são apresentados nas **Tabelas II.4.4, II.4.5 e II.4.6**

Os baixos valores do coeficiente de Freundlich (K_F) e K_D indicam que a SDZ, SDM e SQX possuem alta mobilidade nos solos estudados. De acordo com os

valores estabelecidos pelo IBAMA (1990) para avaliação da capacidade de movimentação de substâncias químicas no solo, valores de K_D compreendidos entre 0 a 24 L kg⁻¹ caracterizam uma baixa capacidade de adsorção e um maior transporte no solo e alcance da água subterrânea por processos de lixiviação. Dos resultados obtidos e apresentados nas **Tabelas II.4.4, II.4.5 e II.4.6**, a adsorção das sulfonamidas (SDZ, SDM e SQX) nos quatros solos estudados apresentou valor K_F inferior a 24 $\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$, sendo, portanto, considerado de acordo com a classificação do IBAMA (1990), de baixa adsorção.

Os coeficientes de distribuição foram normalizados pelo conteúdo de carbono orgânico (CO) dos solos resultando, assim, no coeficiente K_{CO} (**Tabelas II.4.4, II.4.5 e II.4.6**), uma vez que a adsorção pode estar relacionada com o teor de carbono orgânico do solo (**Equação II.1.4**). Expressando a sorção como uma função do teor de carbono orgânico do solo se reduz a variabilidade entre os solos (Cox *et al.*, 1997).

A variação no coeficiente angular (1/n) das isotermas de sorção (**Tabela II.4.4, II.4.5 e II.4.6**), obtidas dos diferentes solos estudados, revelou que a sorção de SDZ, SDM e SQX nos diferentes solos é um fenômeno complexo envolvendo diferentes tipos de sítios de sorção (Felsot & Dahm, 1979).

No intervalo de concentração estudado, as isotermas de Freundlich foram ligeiramente não lineares com coeficiente 1/n menor do que a unidade (**Tabela II.4.4, II.4.5 e II.4.6**), indicando que os sítios de maior energia são ocupados primeiro, seguido pela adsorção em sítios com menor energia (Sukul *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem também uma diminuição na adsorção com o aumento da concentração inicial.

As isotermas de dessorção representam a quantidade de SDZ, SDM e SQX ainda adsorvida por grama de solo como função da concentração no equilíbrio depois de um ciclo de dessorção. Os dados dos experimentos de dessorção para SDZ, SDM e SQX foram linearizados adequadamente pela isoterma de Freundlich na forma logarítmica com coeficientes de correlação de $0,984 < r < 0,999$ (**Tabela II.4.4**); $0,978 < r < 0,999$ (**Tabela II.4.5**) e $0,969 < r < 0,999$ (**Tabela II.4.6**), respectivamente. Os valores de K_F para a dessorção de SDZ e SDM foram maiores do que os da

adsorção para os solos N2, S1 e S2. Para a SQX os valores de K_F no processo de dessorção foram maiores do que os da adsorção para todos os solos. Esses resultados indicam que parte da SDZ, SDM e SQX adsorvida inicialmente nos solos não foi dessorvida no ensaio de dessorção com cloreto de cálcio. Entretanto, para o solo N1 o valor de K_F para a dessorção foi menor do que o K_F da adsorção demonstrando que a SDZ e SDM dessorvem mais facilmente do solo N1 (arenoso). Os valores de $1/n$ no processo de dessorção foram menores do que a unidade em todos os solos estudados indicando, assim, uma relação não linear entre a concentração de SDZ, SDM e SQX e a sorção nestes solos. No geral, uma baixa dessorção indica uma forte retenção.

A histerese (H) é um fenômeno comum observado se o coeficiente de distribuição é maior na etapa de dessorção depois de encontrar o equilíbrio aparente do que na etapa de adsorção, indicando que o composto uma vez sorvido é de difícil dessorção. Isso tem sido reportado para muitos compostos orgânicos em que o solo ou o lodo agem como sorventes (Kim *et al.*, 2005 e Huang *et al.*, 2003). A não reversibilidade do processo de adsorção pode ser devido ao aprisionamento de moléculas sorvidas na matéria orgânica solúvel (Huang & Weber, 1998) ou pelo aprisionamento em solos com baixo teor de carbono orgânico e com alta área superficial interna (Huang *et al.*, 2003). No presente estudo, histerese foi observada para a SDZ em todos os quatro tipos de solos, enquanto para a SDM e SQX a histerese foi verificada apenas nos solos S1 e S2.

A magnitude da histerese foi avaliada usando a razão do coeficiente de adsorção e dessorção das isotermas de Freundlich. Os valores de $1/n_{ads}$ são maiores do que os valores de $1/n_{des}$, sugerindo que a adsorção de SDZ nos solos não foi reversível. Valores de histerese para todos os solos estão listados na **Tabela II.4.4**. Os valores de histerese próximo de 1 significam que o processo de dessorção é tão favorável quanto o processo de adsorção; portanto o fenômeno de histerese é ausente. Por outro lado, um valor de $H < 1$ indica que a razão de dessorção é menor do que a razão de adsorção e, conseqüentemente, ocorre a histerese. Em todos os estudos de dessorção foi observado que a quantidade de SDZ dessorvida foi menor do que a quantidade total de SDZ sorvida (**Tabelas II.4.4, Figura II.4.3 e II.4.4**),

indicando uma histerese positiva e sugerindo que uma quantidade significativa de SDZ fica mesmo no processo de dessorção fortemente ligada às partículas do solo. Os maiores coeficientes de histerese correspondem aos solos N2, S1 e S2 indicando que, embora estes solos tenham uma maior capacidade de sorção do que o solo N1, quantidades na faixa de 20 a 40% (neste estudo) do total de SDZ adsorvida podem ser dessorvidas. Por conseguinte, aproximadamente 90% de SDZ (do total adsorvido) pode ser dessorvida do solo N1.

Histerese negativa é observada quando a sensibilidade da isoterma de dessorção é maior do que a sensibilidade da isoterma de adsorção, fato este ocorrido para a SDM e SQX nos solos N1 e N2. Os valores de $1/n_{ads}$ são maiores do que os valores de $1/n_{des}$ para os solos S1 e S2, sugerindo que a adsorção de SDM e SQX nos solos não foi reversível. Valores de histerese para todos os solos estão listados nas **Tabelas II.4.5 e II.4.6**. Os valores de H próximo de 1 (solo N1 e N2) significam que o processo de dessorção é tão favorável quanto o processo de adsorção; portanto o fenômeno histerese é ausente. Por outro lado, um valor de $H < 1$ (S1 e S2) indica que a razão de dessorção é menor do que a razão de adsorção e, conseqüentemente, ocorre histerese. Os coeficientes de histerese determinados para os solos S1 e S2 indicam que, embora estes solos tenham alta capacidade de sorção, quantidades na faixa de 30 a 40% e 20 a 60% (neste estudo) do total de SDM e SQX adsorvidas, respectivamente, podem ser dessorvidas.

O coeficiente de distribuição (K_D) reportado na literatura varia com respeito à textura e propriedades dos solos (Boxall *et al.*, 2002 e Sukul *et al.*, 2008). Os valores de K_D para sulfacloropiridazina (1,8 a 0,9 L kg⁻¹ para solos argiloso e arenoso, respectivamente) aumentaram com o aumento do pH do solo (Boxall *et al.*, 2002). Efeitos similares foram encontrados por Thiele-Bruhn e Aust (2004) nos estudos de sorção de cinco diferentes sulfonamidas em solo argiloso com valores de K_D variando entre 0,3 a 2,0 L kg⁻¹.

Todos os coeficientes de distribuição e os coeficientes de Freundlich apresentados neste estudo foram similares a outras sulfonamidas como reportados por Thiele-Bruhn *et al.* (2004), sendo que os valores de K_D aumentaram na seguinte

ordem: sulfanilamida ($1,7 \text{ L kg}^{-1}$) \leq sulfadiazina ($2,0 \text{ L kg}^{-1}$) $<$ sulfadimetoxina ($2,3 \text{ L kg}^{-1}$) \leq sulfadimidina ($2,4 \text{ L kg}^{-1}$) $<$ sulfapiridina ($3,5 \text{ L kg}^{-1}$).

Coefficientes de sorção (K_F) da SDZ no presente estudo variaram de $0,45$ a $2,6 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, enquanto para a SDM de $1,4$ a $6,4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e SQX de $5,5$ a $19 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Similares dados de sorção têm sido encontrados para outros antimicrobianos, assim como olaquinox com coeficientes de sorção na faixa de $0,69$ a $1,67 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (Rabølle & Spllid, 2000). Para outras sulfonamidas, assim como sulfametazina, o coeficiente de sorção varia de $0,58$ a $3,91 \text{ L kg}^{-1}$ em solos com porcentagem de carbono orgânico variando de $0,1$ a $3,8 \%$ e pH $5,5$. No entanto, em pH 9 os valores do coeficiente de sorção diminuíram para $0,23$ (solo com $0,1\%$ CO) e $1,16 \text{ L kg}^{-1}$ (solo com $3,8\%$ CO) (Lertpaitoonpan *et al.*, 2009).

Os coeficientes de Freundlich apresentados na **Tabela II.4.4** para a SDZ indicam menor sorção do que os encontrados por Sukul *et al.* (2008) em solos com teor de carbono orgânico de $2,9\%$ ($24,3 \text{ L kg}^{-1}$). Isso pode ser atribuído às diferenças nas propriedades do solo como conteúdo de matéria orgânica, frações minerais, capacidade de troca catiônica e pH. Para a SDM, Chu *et al.* (2010) encontraram valores de K_D entre $1,09$ a $4,00 \text{ L kg}^{-1}$. Enquanto Sanders *et al.* (2008) encontraram para a mesma sulfonamida valores de K_D entre $0,4$ (arenoso) a $25,8 \text{ L kg}^{-1}$ (argiloso). Drillia *et al.* (2005) determinaram para sulfametoxazol valores de K_D entre $37,6$ (alto teor de matéria orgânica) a $0,23 \text{ L kg}^{-1}$ (baixo teor de matéria orgânica).

Figuroa-Diva *et al.* (2010) estudaram a influência da mudança de grupos substituintes na estrutura base das tetraciclina, fluoroquinolonas e sulfonamidas. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a sorção de tetraciclina e fluoroquinolonas é governada pela interação da estrutura base destes compostos com o solo; entretanto, a sorção é sensível às variações de pH. A sorção é influenciada fortemente pela capacidade de troca catiônica com pouco efeito dos grupos substituintes. Ao contrário da classe das tetraciclina e fluoroquinolonas, a sorção das sulfonamidas foi sensível aos grupos substituintes na estrutura base das sulfonamidas uma vez que os estudos foram realizados em condições de pH no qual as sulfonamidas estavam, majoritariamente, na sua forma neutra.

Muitas vezes os valores de pK_a dos antimicrobianos estão na faixa de pH do solo e a carga dos antimicrobianos pode variar conforme as mudanças de pH do mesmo. Sulfonamidas são ligeiramente solúveis em água e são compostos polares; assim, a adsorção-dessorção destes compostos é influenciada pela variação do pH o que pode estar relacionado a ionização de sulfonamidas anfotéricas (Boxall *et al.*, 2002 e Tolls, 2001). As sulfonamidas podem existir no ambiente como espécie catiônica, neutra e/ou aniônica (Sukul *et al.*, 2008). Os tipos de solo avaliados neste estudo possuem pH na faixa de 4,1 a 5,0. Portanto, considerando os valores de pK_a da SDZ ($pK_{a1} = 1,64$ e $pK_{a2} = 6,80$), da SDM ($pK_{a1} = 3,0$ e $pK_{a2} = 6,21$) e da SQX ($pK_{a1} = 2,3$ e $pK_{a2} = 6,00$) é esperado que as três sulfonamidas se encontrem majoritariamente na forma neutra.

As tetraciclinas e fluoroquinolonas interagem com o solo primeiramente por meio de troca catiônica e reações de complexação, sendo que a mudança dos grupos substituintes na estrutura base desta classe de antimicrobianos tem pouco efeito na sorção (Nowara *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2005; Sassman and Lee, 2005). Contudo, a classe das sulfonamidas interage primeiramente por particionamento com a matéria orgânica (Thiele-Bruhn *et al.*, 2004) e o mecanismo de sorção é conhecido por ser sensível aos substituintes na estrutura base das sulfonamidas por exclusão hidrofóbica e/ou interações polares (Thiele-Bruhn *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2005).

Boyd (1982) demonstrou que a adsorção do fenol em solo aumentava ao adicionar diferentes substituintes doadores de elétrons à estrutura do fenol.

Thiele-Bruhn *et al.* (2004) avaliaram a sorção de cinco sulfonamidas e do ácido *p*-aminobenzóico em solo e nas frações orgânico-mineral de diferentes tamanhos de partículas. Os autores demonstraram que a adsorção aumentou com a aromaticidade e a eletronegatividade do grupo funcional ligado à estrutura base das sulfonamidas (**Figura I.3.1**). A adsorção verificada pelos autores aumentou na seguinte ordem assim como sua aromaticidade: ácido *p*-aminobenzóico < sulfanilamida < sulfadiazina < sulfadimetoxina < sulfametazina < sulfapiridina. Neste contexto, os autores atribuíram que a adsorção foi maior com a sulfapiridina devido à afinidade do anel N-heterocíclico com os sítios de troca, enquanto a adsorção do

ácido *p*-aminobenzóico ocorreu principalmente através do grupo *p*-amino e em menor extensão por meio do grupo carboxílico.

Neste estudo, a SQX apresentou maior adsorção nos quatro solos estudados seguida pela SDM e SDZ. A introdução do grupo funcional benzopirazina à estrutura base das sulfonamidas (sulfonil fenil amina; **Figura I.3.1**) causou uma maior adsorção da SQX comparada aos valores de K_D da SDM e SDZ, principalmente devido a sua aromaticidade (**Figura I.3.1**). Assim sendo, a introdução do grupo funcional metoxipirimidina à estrutura base das sulfonamidas causou uma maior adsorção da SDM do que a introdução do grupo funcional pirimidina (diazina) à estrutura base das sulfonamidas. Estes resultados corroboram com os já reportados pela literatura, ou seja, a aromaticidade bem como a extensão e distribuição da eletronegatividade das moléculas afetam a adsorção, além da capacidade de ionização das sulfonamidas.

Todavia, mais estudos são necessários para esclarecer o papel dos diferentes componentes do solo na sorção de SDZ, SDM e SQX no solo.

II.5. CONCLUSÕES

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, usando coluna C_{18} associada ao detector de arranjo de diodos é adequada para determinar com confiabilidade SDZ, SDM e SQX nas soluções de solo obtidas dos ensaios de adsorção e dessorção. Nas condições experimentais estabelecidas não foi verificado efeito matriz para sulfadiazina e sulfadimetoxina, assim, as quantificações das sulfonamidas nas soluções de solo foram realizadas mediante padronização externa em solução de cloreto de cálcio. Enquanto, a sulfaquinoxalina foi quantificada mediante curva na matriz uma vez que foi observado efeito matriz.

No presente estudo, a concentração inicial em contato com o solo foi de três ordens de magnitude maior que o LOD, tanto para SDZ quanto para a SDM e SQX. Nestas condições, as concentrações de SDZ, SDM e SQX na fase aquosa, tanto na

adsorção quanto na dessorção, foram maiores que o limite de quantificação, garantindo assim a confiabilidade dos resultados.

Os dados experimentais para adsorção e dessorção se ajustaram satisfatoriamente a isoterma de Freundlich. A adsorção de SDZ, neste estudo, foi maior no latossolo vermelho escuro (N2) seguido pelo solo podzólico argiloso (S2), latossolo vermelho amarela (S1), respectivamente; a areia quartzosa (N1) foi o solo com menor capacidade de adsorção. A adsorção de SDM, porém foi maior no solo podzólico argiloso (S2), seguida pelo solo latossolo vermelho amarela (S1), latossolo vermelho escuro (N2), respectivamente; sendo a areia quartzosa (N1) o solo com menor adsorção. Para a SQX a maior adsorção ocorreu no solo podzólico argiloso (S2), seguido por latossolo vermelho escuro (N2) e depois latossolo vermelho amarela (S1), sendo a areia quartzosa (N1) o solo com menor adsorção.

No presente estudo foi observado que as sulfonamidas possuem maior adsorção em solos com alto teor de carbono orgânico e argila. Os solos correspondentes a estas características são solo podzólico argiloso (Argissolos vermelho-amarelos, S2) e latossolo vermelho escuro (Latossolos vermelhos, N2), sendo estes os solos de maior representatividade do estado com cobertura de 41,2% e 30,2% da superfície do estado, conforme apresentado no mapa pedológico do Estado de São Paulo (**Figura II.1.2**). No geral, os altos valores do coeficiente de dessorção em relação aos baixos valores dos coeficientes de adsorção indicam efeito de histerese positivo e leva a concluir que qualquer quantidade de SDZ, SDM e/ou SQX sorvida no solo não será facilmente dessorvida na faixa de pH do solo estudado.

A adsorção de SQX foi maior do que SDM que, por conseguinte, foi maior que a SDZ em todos os solos estudados. Os resultados são possivelmente devido a aromaticidade e distribuição eletrônica dos grupos funcionais adicionados a estrutura base das sulfonamidas. Todavia, estudos adicionais deverão ser realizados para esclarecer e compreender a capacidade de sorção das sulfonamidas em solos.

No contexto geral, os valores dos coeficientes de Freundlich indicam que as sulfonamidas são muito móveis e lixiviáveis devido a sua baixa capacidade de sorção em solos.

- CAPÍTULO III -
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acar, J.F., Moulin, G. Antimicrobial resistance at farm level. *Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)*, v. 25, p. 775-792, **2006**.

Aga, D.S., O'Connor, S., Ensley, S., Payero, J.O., Snow, D., Tarkalson, D. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 7165-7171, **2005**.

Amir, S., Hafidi, M., Lemee, L., Merlina, G., Guiresse, M., Pinelli, E., Revel, J.C., Bailly, J.R., Ambles, A. Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 410-422, **2006**.

Andreu, V., Blasco, C., Picó, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, p. 534-556, **2007**.

ANVISA, **2009**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 37, de 06/07/2009. Publicado no Diário Oficial da União nº 128, página 40, de 08/07/2009. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e9d6f98048e524df8f859f466b74119d/RDC_37_2009_Trata%2Bda%2Badmissibilidade%2Bdas%2BFarmacop%C3%A9ias%2B estrangeiras..pdf?MOD=AJPERES. Acessado em 07/2012.

ANVISA, **2003**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003. Publicada no Diário Oficial da União de 02/05/2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acessado em 07/2012.

Baran, W., Sochaka, W., Wardas, W. Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere*, v. 65, p. 1295-1299, **2006**.

Batchelder, A.R. Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in soil systems. *Journal of Environmental Quality*, v. 11, 675-678, **1982**.

Batchelder, A.R. Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in liquid cultures. *Journal of Environmental Quality*, v. 10, 515-518, **1981**.

BRITISH PHARMACOPOEIA. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances: v. I & II, **2009**.

Boxall, A.B.A. Veterinary medicines and the environment. In *Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology, Part 2*, v. 99, p. 291-314, **2010**.

Boxall, A.B.A, Blackwell, P., Cavalho, R., Kay, P., Tolls, J. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters*, v. 131, p. 19-28, **2002**.

Boyd, S.A. Adsorption of substituted phenols by soil. *Soil Science*, v. 134, p. 337-343, **1982**.

Calvet, R. Adsorption of organic chemicals in soil. *Environmental Health Perspectives*, v. 83, p. 145-177, **1989**.

Capleton, A.C., Courage, C., Rumsby, P., Holmes, P. Stutt, E., Boxall, A.B.A., Levy, L. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicology Letters*, v. 163, p. 213-223, **2006**.

CAS, SciFinder Scholar. Chemical Abstract Service, American Chemical Society, Washington, DC, **2012**.

Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S.M., Gupta, S.C. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *Journal of Environmental Quality*, v. 34, p. 1952-1957, **2005**.

Chesworth, W. *Encyclopedia of soil science*, Springer, Dordrecht, **2008**.

Chivarino, B., Crestoni, M.A., Di-Marzio, A., Fornarini, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications*, v. 706, p. 269-277, **1998**.

Chu, B., Goynes, K.W., Anderson, S.H., Lin, C., Udawatta, R.P. Veterinary antibiotic sorption to agroforestry buffer, grass buffer and cropland soils. *Agroforest Systems*, v. 79, p. 67-80, **2010**.

Costa, E.O., Uso de antimicrobianos na mastite. In Spinosa, H.S., Górnjak, S.L., Bernardi, M.M. (Eds) *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Guanabara Koogn, Rio de Janeiro, p. 422-433, **1999**.

Cox, L., Koskinen, W.C., Yen, P.Y. Sorption-desorption of imidacloprid and its metabolites in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v., 45, p. 1468-1472, **1997**.

de la Cruz, M.S., Soares, R.F., Marques, A.S.F., Aquino-Neto, F.R. Development and validation of analytical method for sulfonamide residues in eggs by Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry based on the Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 454-461, **2011**.

De Liguoro, M. Fioretto, B., Poltronieri, C. Gallina, G. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. *Chemosphere*, v. 75, p. 1519-1524, **2009**.

Dejaegher, B., Heyden, Y.V. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 138-157, **2007**.

Díaz-Cruz, M.S., López, M.J., Barceló, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, p. 340-344, **2003**.

Domagk, G. (**1939**). Gerhard Domagk – Biography. Nobel prize. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1939/domagk-bio.html. Acessada em junho de 2012.

Drews, J. Drug Discovery: A historical perspective. *Science*, v. 287, p. 1960-1964, **2000**.

Drillia, P., Stamatelatou, K., Lyberatos, G. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere*, v. 60, p. 1034-1044, **2005**.

Ehlers, G.A.C., Loibner, A.P. Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterization and (bio)availability prediction. *Environmental Pollution*, v. 141, p. 949-512, **2006**.

El Anwar, F.M., El Walily, A.M., Hay, M.H.A, El Swify, M. The analysis of a triple sulfonamide in pharmaceutical powder form by HPLC. *Analytical Letters*, v. 24, p. 767-779, **1991**.

Embrapa, **2012**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/marco/4a-semana/embrapa-lanca-versao-atualizada-do-mapa-de-solos-do-brasil>. Acessada em março de 2012.

Embrapa, **2009**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2ª ed. (revisada), Rio de Janeiro, 367p, 2009.

Embrapa, **2006**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2ª ed., Rio de Janeiro, 306p, 2006.

Embrapa, **1999**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro, 412p, 1999.

EMA, **2008**. European Medicines Agency: Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1, Revised Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medical Products in Support of the VICH Guidelines GL6 and GL38.

EMA, **2007**. European Medicines Agency: Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). EMA/CVMP/EWP/005/2000-Rev.2.

EPA, **2007**. Environmental Protection Agency. Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Sampling Methods for Chemical and Radiochemical Parameters, 2007.

FAO, **2006**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guideline for soil description, 4th ed., Roma, 2006.

FAO/WHO, **1993**. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. Codex Alimentarius Commission. Recommended International Code of Practice for

Control of the Use of Veterinary Drugs [CAC/RCP 38, 1993]. Geneva: FAO/WHO; 1993.

Farmacopeia Brasileira, v. 2, 5^a ed., Brasília: ANVISA, **2010**.

FDA, **2012**. Food and Drug Administration. Disponível em: http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm299054.htm?utm_campaign=Google2&utm_source=fdaSearch&utm_medium=website&utm_term=cep_halosporin&utm_content=1. Acessada em maio de 2012.

Felsot, A., Dahm, P.A. Sorption of organophosphorous and carbamate insecticides by soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 27, p. 557-563, **1979**.

Figueroa-Diva, R.A., Vasudevan, D., MacKay, A.A. Trend in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere*, v. 79, p. 786-793, **2010**.

Foth, H.D. *Fundamentals of Soil Science*. Michigan State University. John Wiley & Sons, 8th ed., New York, **1990**.

Fuchs, S.M., Elsner, P. Sulfonamides in dermatology. *Clinics in Dermatology*, v. 21, p. 7-11, **2003**.

Gu, C., Karthikeyan, K.G., Sibley, S.D., Pedersen, J.A. Complexation of the antibiotics tetracycline with humic acid. *Chemosphere*, v. 66, p. 1494-1501, **2007**.

Halling-Sørensen, B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, v. 40, p. 451-460, **2001**.

He, Mengchang, Shi, Yehong, Lin, Chunye. Characterization of humic acids extracted from the sediments of the various rivers and lakes in China. *Journal of Environmental Science*, v. 20, p. 1294-1299, **2008**.

Heuer, H., Smalla, K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotics resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology.*, v 9, p. 657-666, **2007**.

Huang, W., Peng, P., Yu, Z., Fu, J. Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry*, v. 18, p. 955-972, **2003**.

Huang, W.L., Weber, W.J. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 11. Slow concentration dependent sorption rates. *Environmental Science and Technology*, v. 32, p. 3549-3555, **1998**.

IBAMA, **1990**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, 1990.

IBGE, **2007**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Manual Técnico de Pedologia. 2ª ed., Rio de Janeiro, 2007.

ICH, **2005**. Internacional Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2 (R1), 2005.

INMETRO, **2007**. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2ª revisão, 2007.

Iyer, H.V. History revisited – prontosil red. In.: Letters to the Editor. The Journal of Emergency Medicine, v. 35, p. 209-211, **2008**.

Jones, A.D., Bruland, G.L., Agrawal, A.G., Vasudevan, D. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 24, 761-770, **2005**.

Jorgensen, S.E., Halling-Sørensen, B. Drugs in the environment. Chemosphere, v. 40, p. 691-699, **2000**.

Kar, A. Sulfonamides. In.: Medicinal Chemistry. Editor 3th Ed. New Age International, New Delhi, cap. 18, p. 504-531, **2005**.

Karci, A., Balcioğlu A., Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. Science and the Total Environment, v. 407, p. 4652-4664, **2009**.

Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological Indicators, v. 8, p. 1-13, **2008**.

Kim, S.; Eichhorn, P.; Jensen, J.; Weber, S.; Aga, D. Removal of antibiotics in wastewater: effect of hydraulic and solids retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. Environmental Science and Technology, v. 39, p. 5816-5823, **2005**.

Kulshrestha, P., Giese, R.F., Aga, D.S. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. Environmental Science and Technology, v. 38, p. 4097-4105, **2004**.

Kümerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, v. 40, p. 701-710, **2000**.

Kurwadkar, S.T.; Adams, C.D.; Meyer, M.T.; Kolpin, D.W. Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 1370-1376, **2007**.

Lavorenti, A., Prata, F., Regitano, J.B. Comportamento de pesticidas em solos - Fundamentos. In: Curi, N., Marques, J.J., Guilherme, L.R.G., Lima, J.M., Lopes, A.S., Alvarez, V., V.H. (Org). *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 3, p. 335-400, **2003**.

Lertpaitoapan, W., Ong, S.K., Moorman, T.B. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere*, v. 76, p. 558-564, **2009**.

Liguoro, M.De., Cibin, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Montesissa, C. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, v.52, p.203-212, **2003**.

Loke., M.L., Tjørnelund, J., Halling-Sørensen, B. Determination of the distribution coefficient ($\log K_d$) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere*, v. 48, p. 351-361, **2002**.

MAPA, **2012**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios>. Acessado em 05/2012.

MAPA, **2011^a**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno. Acessado em 06/2011.

MAPA, **2011^b**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2011/iels.jan.11/Iels06/U_PT-MAPA-SDA-577_271210.pdf. Acessado em 06/2011.

MAPA, **2011^c**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica. Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf. Acessado em 06/2011.

MAPA, **1998**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 193 de 12 de maio de 1998. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos>. Acessada em 06/2012.

Martbauer, E. Usleber, E., Schneider, E., Dietrich, R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. *Analyst*, v. 119, p. 2543-2548, **1994**.

Migliore, L., Brambilla, G., Casoria, P., Civitareale, S.C., Gaudio, L. Effect of sulphadimethoxine contamination on barley (*Hordeun disticum L*, Poaceae, Liliopsida). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 60, p. 121-128, **1996**.

Migliore, L., Brambilla, G., Cozzolino, S., Gaudio, L. Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicun miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 52, p. 103-110, **1995**.

Msagati, T.A.M., Ngila, J.C. Voltammetric detection of sulfonamides at a poly(3-methyl-thiophene) electrode. *Talanta*, v. 58, p. 605-610, **2002**.

Nguyen, T.H., Goss, K.U., Ball, W.P. Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the

natural organic matter in soils and sediments. *Environmental Science and Technology*, v. 39, p. 913-924, **2005**.

Nowara, A., Burhenne, J., Spiteller, M. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clayminerals. *Journal of Environmental Quality*, v. 12, p. 1459-1463, **1997**.

OECD, **2000**. Adsorption-Desorption using a Batch Equilibrium Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 106. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2000.

Oleszczuk, P., Pan, B., Xing, B. Adsorption and desorption of oxytetracycline and carbamazepine by multiwalled carbon nanotubes. *Environmental Science and Technology*, v. 43, p. 9167-9173, **2009**.

Pena, M.S., Salinas, F., Mahendero, M.C., Aaron, J.J. Spectrofluorimetric determination of sulphonamides in pharmaceutical compounds and foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.10, p. 805-808, **1992**.

Rabølle, M., Spliid, H. Sorption and mobility of metronidazole, olanquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere*, v. 40, 715-722, **2000**.

Raghuveer, S. Raju, I.R.K., Vastu, D.K., Shrivastava, C.M.R. Colorimetric determination of sulphamethoxazole in pharmaceutical preparations. *Indian Drugs*, v. 132-135, **1993**.

Raich-Montiu, J., Beltrán, J.L., Prat, M.D. Studies on the extraction of sulfonamides from agricultural soils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 807-814, **2010**.

Raich-Montiu, J., Folch, J., Compañó, R., Granados, M. Prat, M.D. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *Journal of Chromatography A*, v. 1172, p. 186-193, **2007**.

Ribani, M. Bottoli, C.B.G, Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F, Melo, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, **2004**.

Ribeiro, C.C., Comunicação pessoal, **2011**.

Sanders, S.M., Srivastava, P., Feng, Y., Dane, J.H., Basile, J., Barnett, M.O. Sorption of the veterinary antimicrobials sulfadimethoxine and ormetoprim in soil. *Journal of Environmental Quality*, v. 37, p. 1510-1518, **2008**.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environmental. *Chemosphere*, v.65, p.725-759, **2006**.

Sassman, S.A., Lee, L.S. Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange. *Environmental Science and Technology*, v. 39, p. 7452-7459, **2005**.

Schulten, H.R. The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 351, p. 62-73, **1995**.

Shabir, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drugs Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, **2003**.

SINDAN. **2012**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acessada em maio de 2012.

Sköld, O. Sulfonamides and Trimethoprim. In.: D.L. Mayers (Ed.), Antimicrobial Drug Resistance. Humana Press, New York, v. 1, cap. 23, p. 259-269, **2009**.

Souza, S.V.C. de, Junqueira, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. Analytical Chimica Acta, v. 552, p. 25-35, **2005**.

Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. Chemosphere, v. 73, p. 1344-1350, **2008**.

Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H.R., Leinweber, P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particles-size fractions. Journal of Environmental Quality, v. 33, p. 1331-1342, **2004**.

Thiele-Bruhn, S., Aust, M.O. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 47, p. 31-39, **2004**.

Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, v. 166, p. 145-167, **2003**.

Thompson, M., Stephen, L.R., Wood, R. Laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, v. 74, p. 835-855, **2002**.

Tolls, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. Environmental Science and Technology, v. 35, p. 3397-3406, **2001**.

USDA, **2010**. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Soil Survey Staff. Keys to Soil Taxonomy, 11^a ed. Washington, 2010.

USP, **2007**. United States Pharmacopeia/National Formulary, United States Pharmacopeial Convention, 25^a ed., Rockville, MD, 2007.

Warren, N., Allan, I.J., Carter, J.E., House, W.A., Parker, A. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments – a review. *Applied Geochemistry*, v. 18, p. 159-194, **2003**.

Wassenaar, T.M. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implications for human health. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 31, p. 155-169, **2005**.

Wehrhan, A., Kasteel, R., Simunek, J., Groeneweg, J., Vereecken, H. Transport of sulfadiazine in soil columns – Experiments and modeling approaches. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 89, p. 107-135, **2007**.

Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 40, p. 723-730, **2000**.

Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, Y., Suzuki, Y., Tanaka, H. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Science & Technology*, v. 53, p. 65-72, **2006**.

Yang, S., Lin, C., Lin, A.Y., Hong, P.A. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions. *Water Research*, v. 45, p. 3389-3397, **2011**.

Ye, S., Yao, Z., Na, G., Wang, J., Ma, D. Rapid simultaneous determination of 14 sulfonamides in wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 2360-2369, **2007**.

Anexo 1

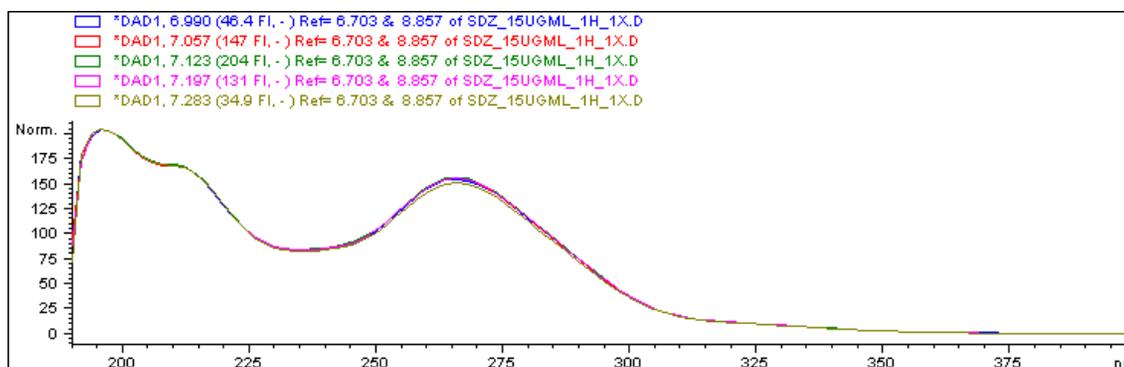


Figura A1. 1. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).

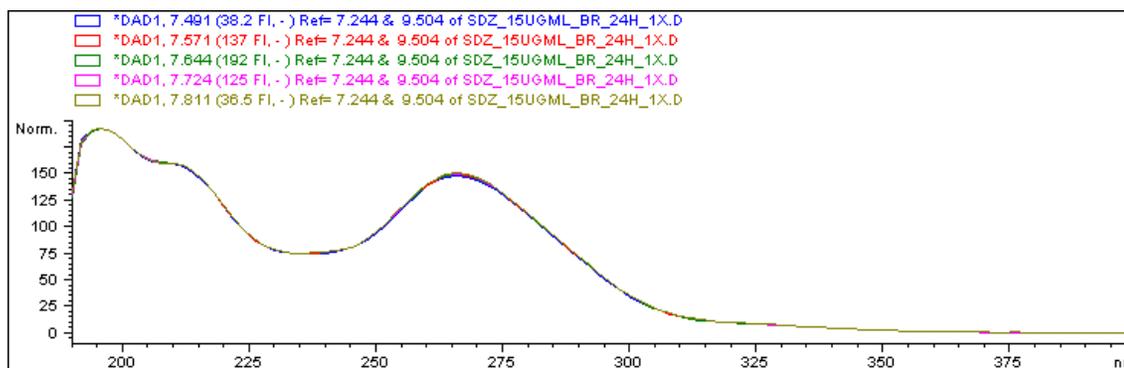


Figura A1. 2. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).

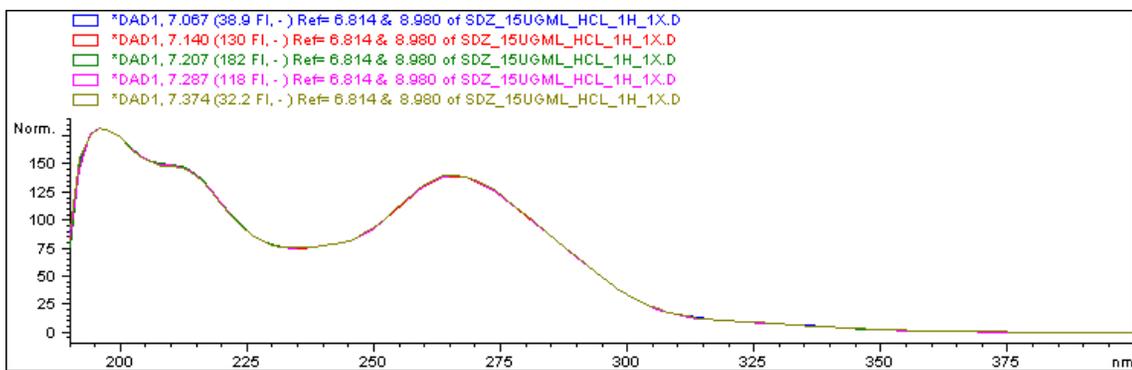


Figura A1. 3. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

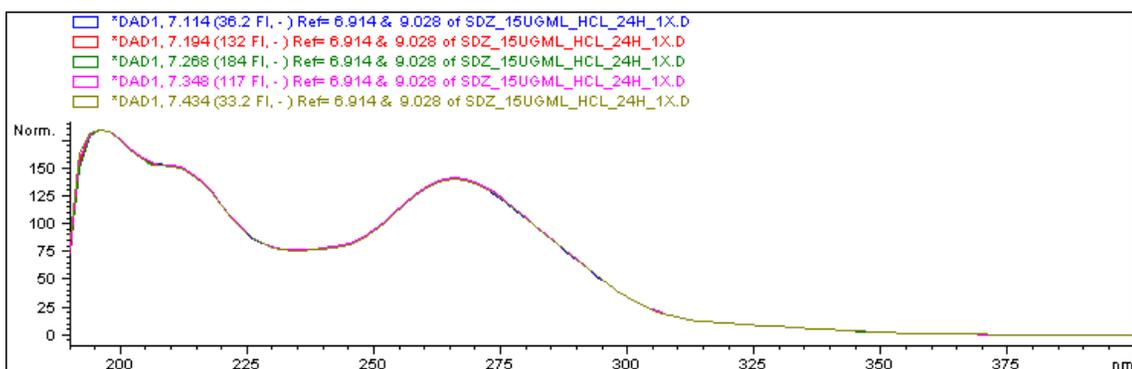


Figura A1. 4. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

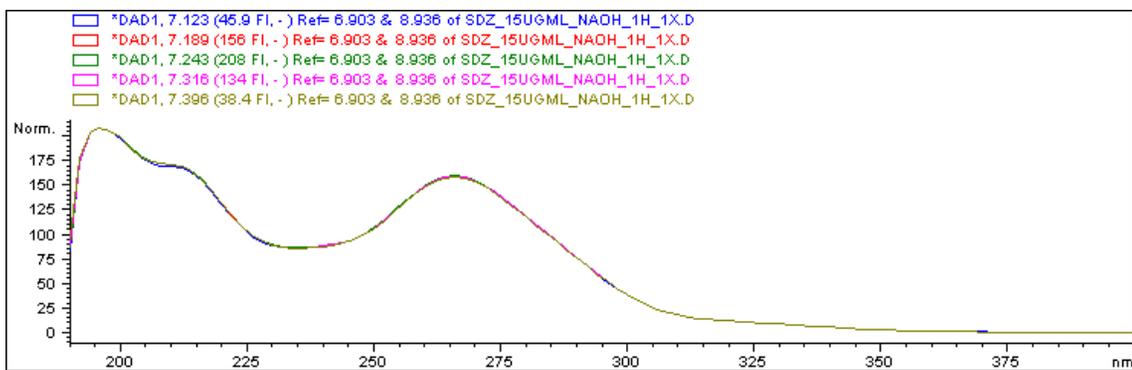


Figura A1. 5. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

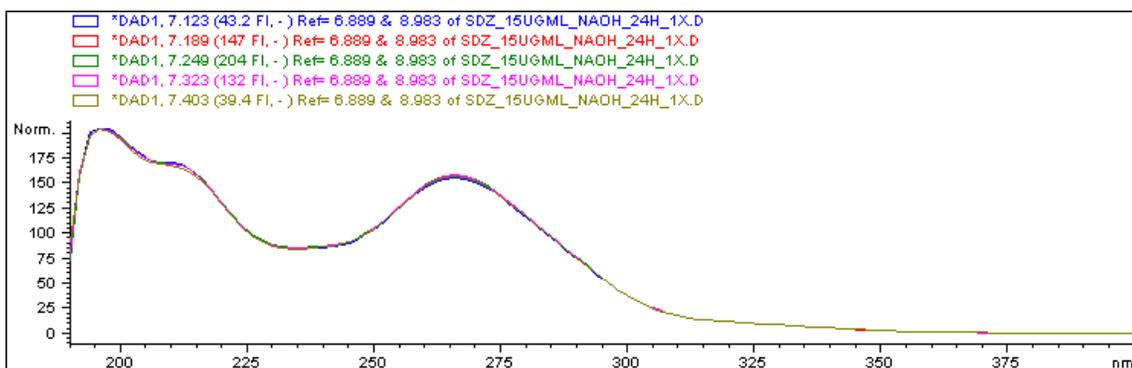


Figura A1. 6. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

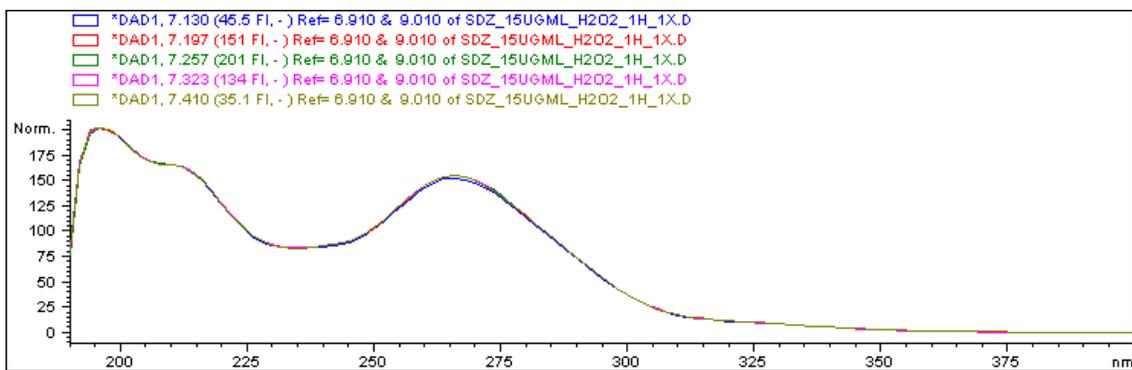


Figura A1. 7. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

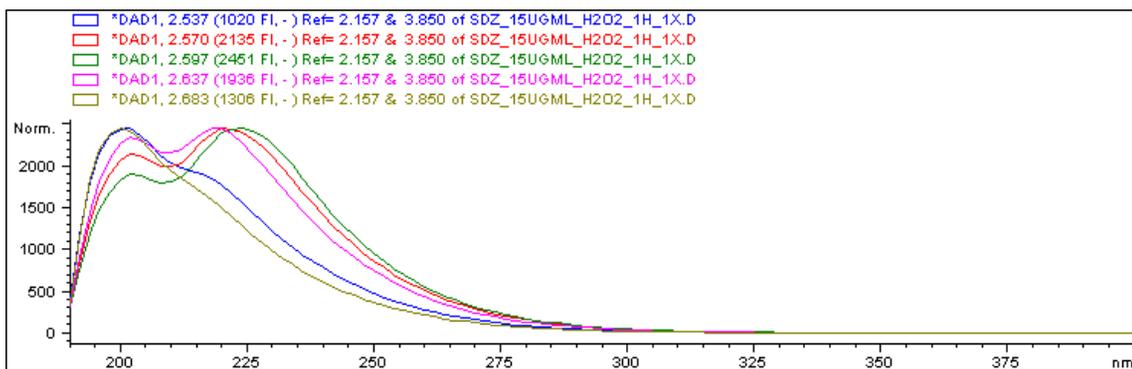


Figura A1. 8. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,595 minutos após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

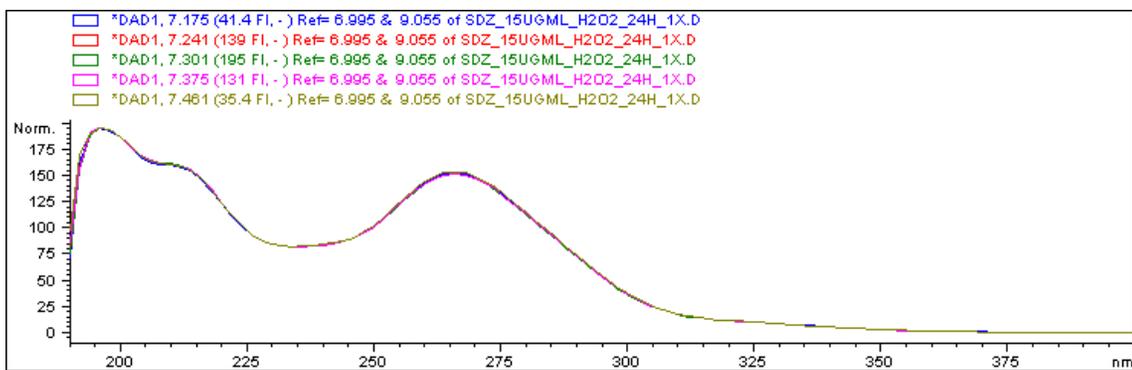


Figura A1. 9. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

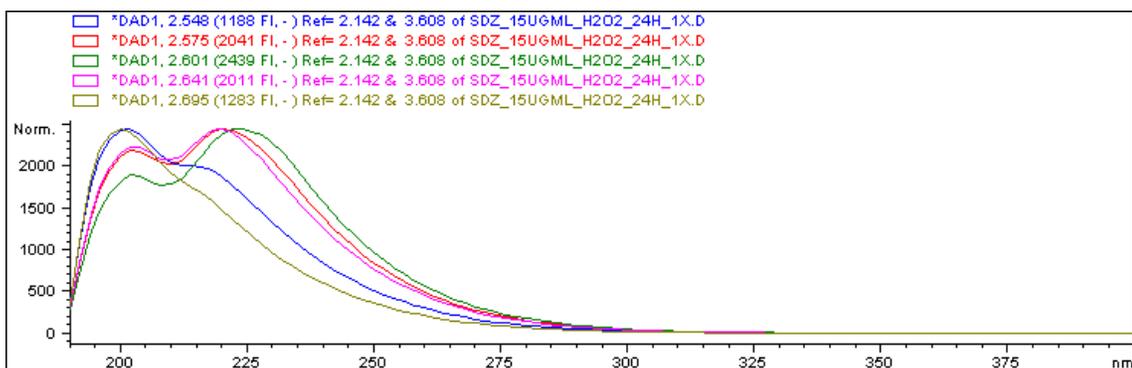


Figura A1. 10. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,595 minutos após 24 horas do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

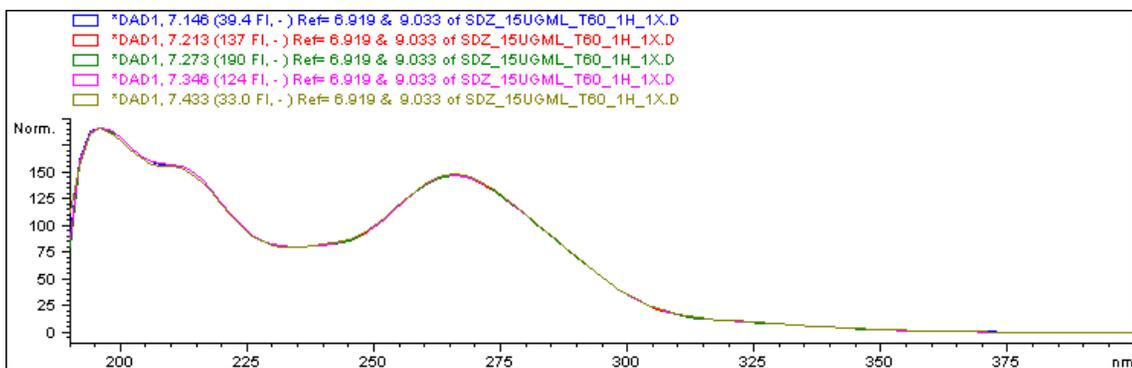


Figura A1. 11. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em temperatura a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

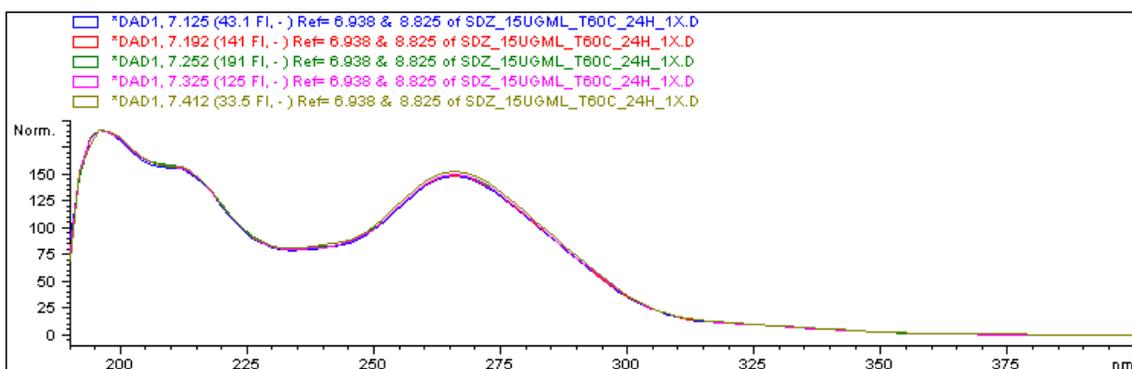


Figura A1. 12. Espectro referente à SDZ ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em temperatura a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Anexo 2

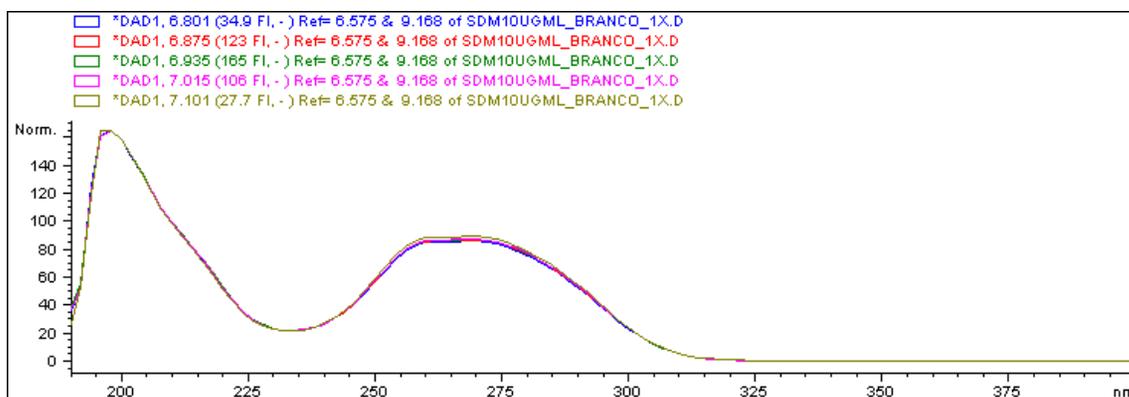


Figura A2. 1. Espectro referente à SDM (10 µg mL⁻¹) após uma hora do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).

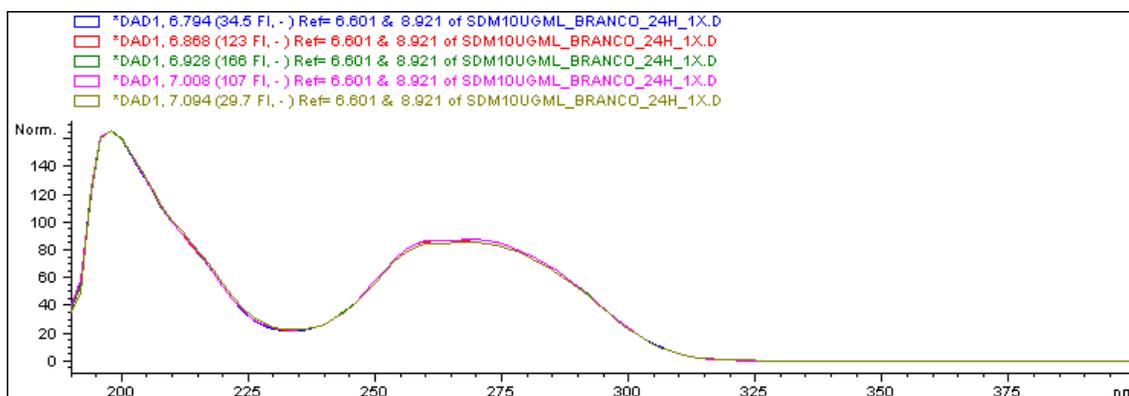


Figura A2. 2. Espectro referente à SDM (10 µg mL⁻¹) após 24 horas do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).

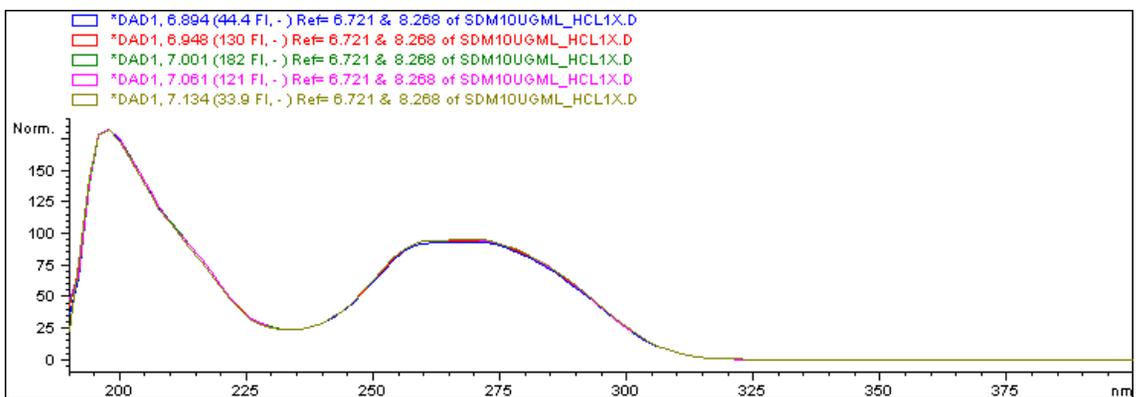


Figura A2. 3. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

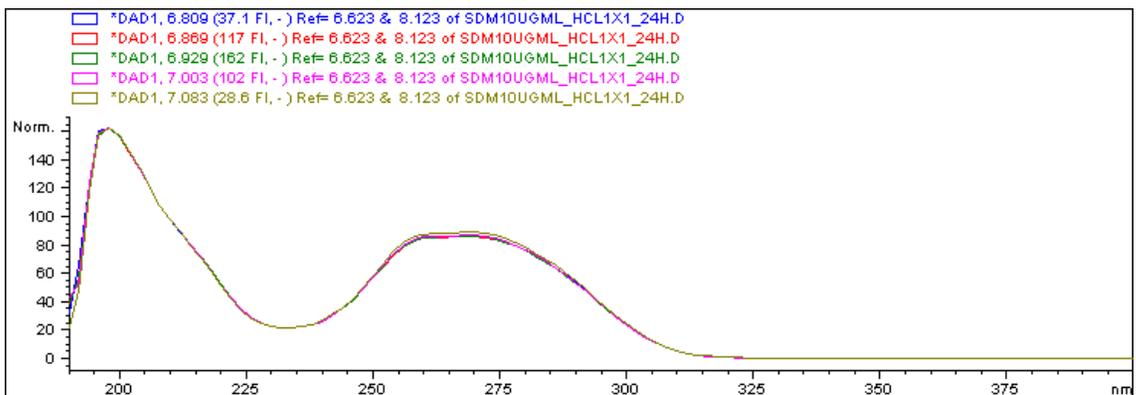


Figura A2. 4. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

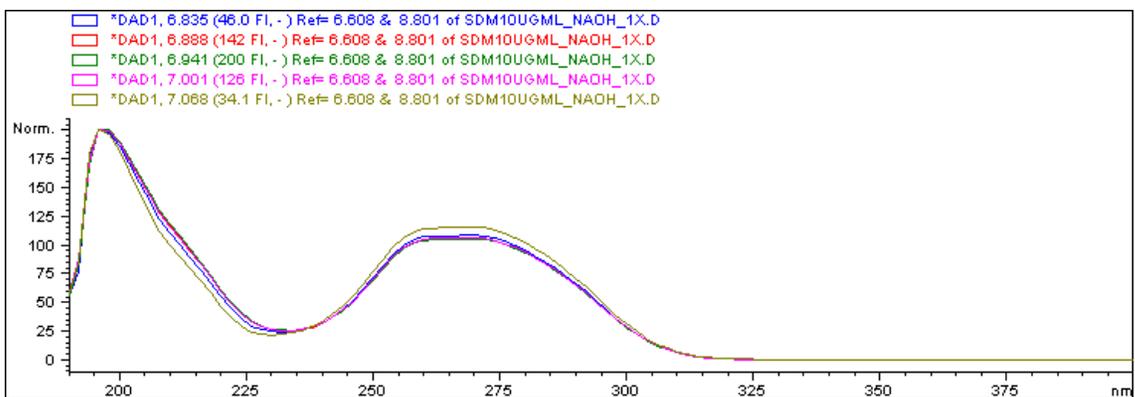


Figura A2. 5. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

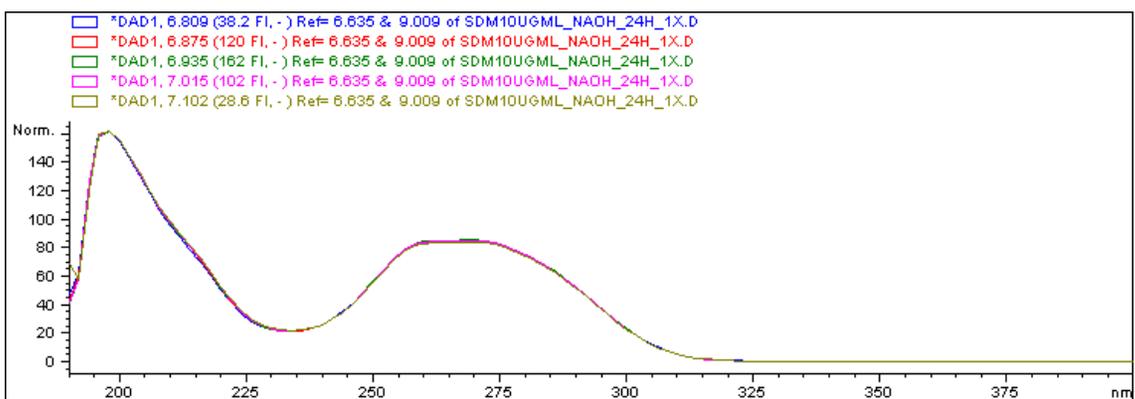


Figura A2. 6. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

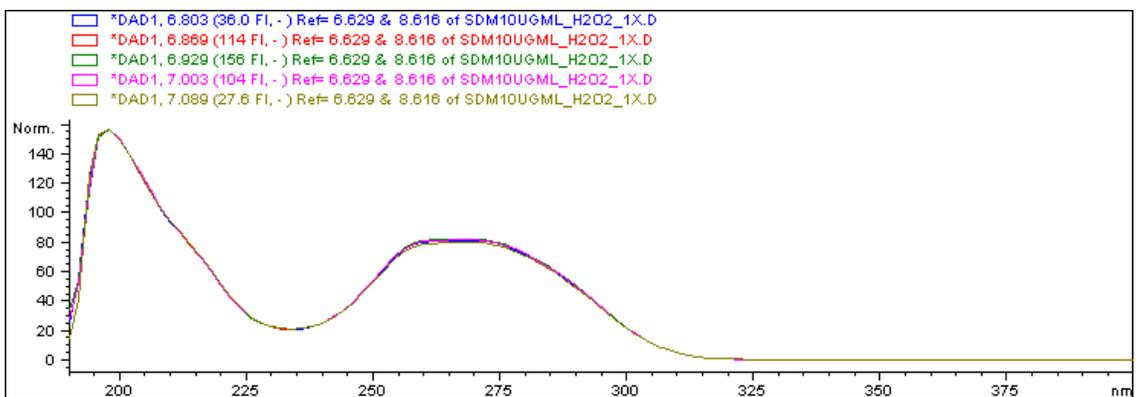


Figura A2. 7. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

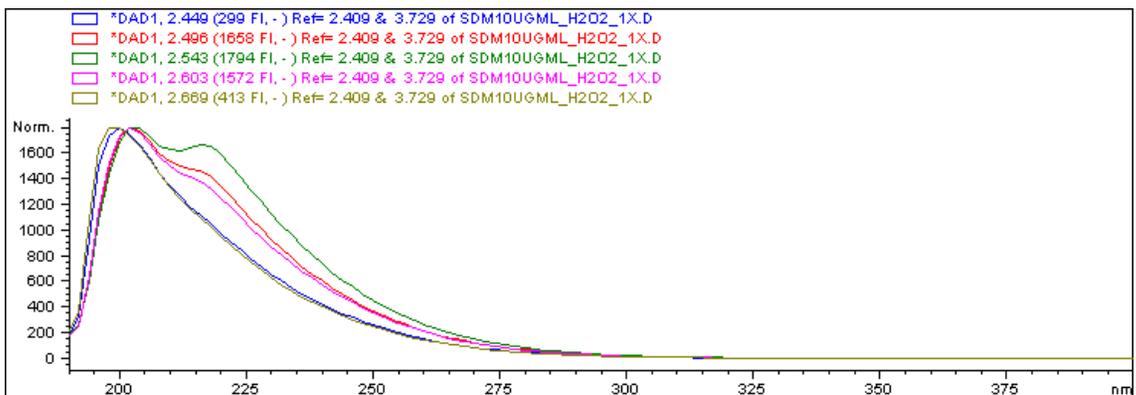


Figura A2. 8. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,542 minutos após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

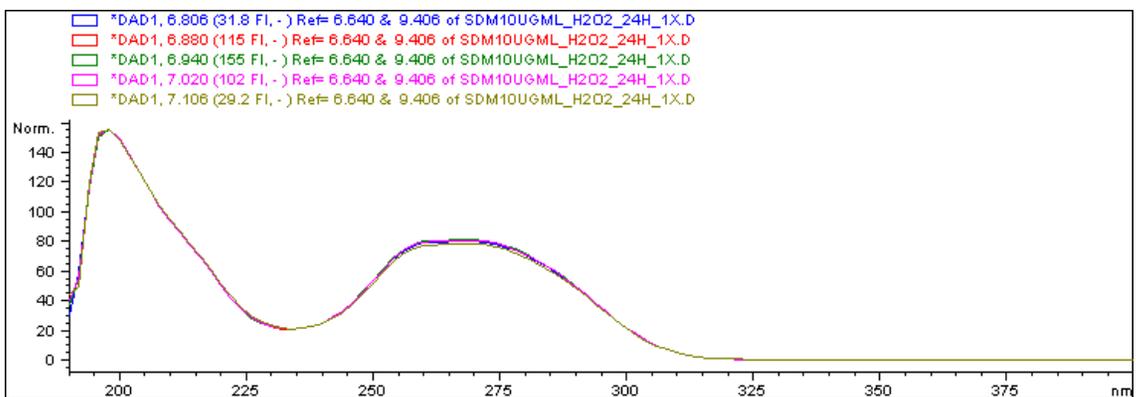


Figura A2. 9. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

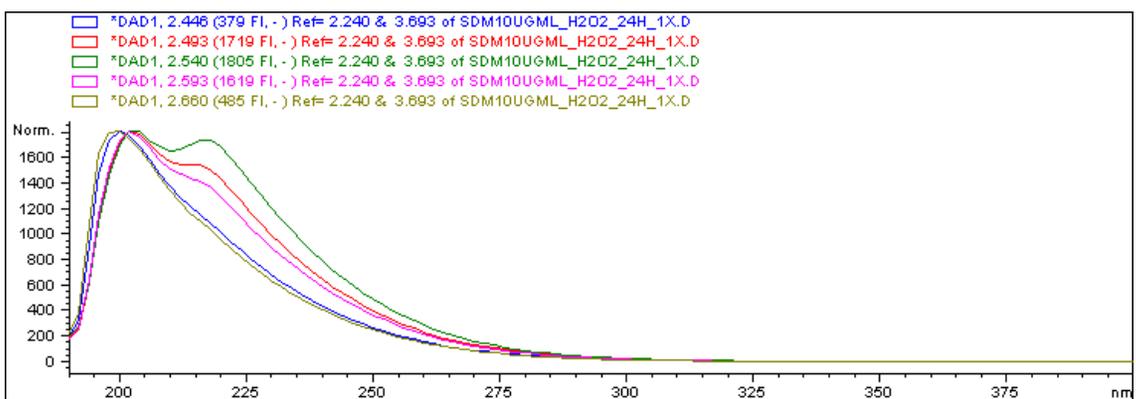


Figura A2. 10. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,542 minutos após 24 horas do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

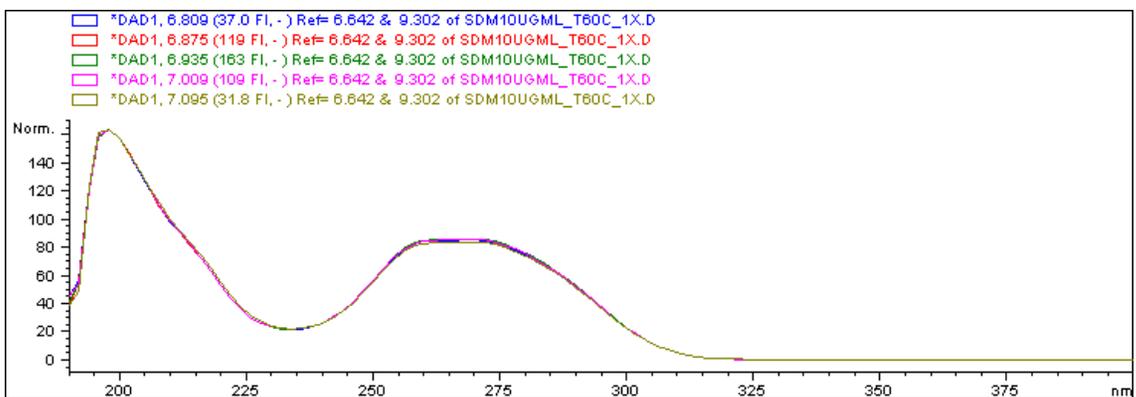


Figura A2. 11. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em temperatura a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

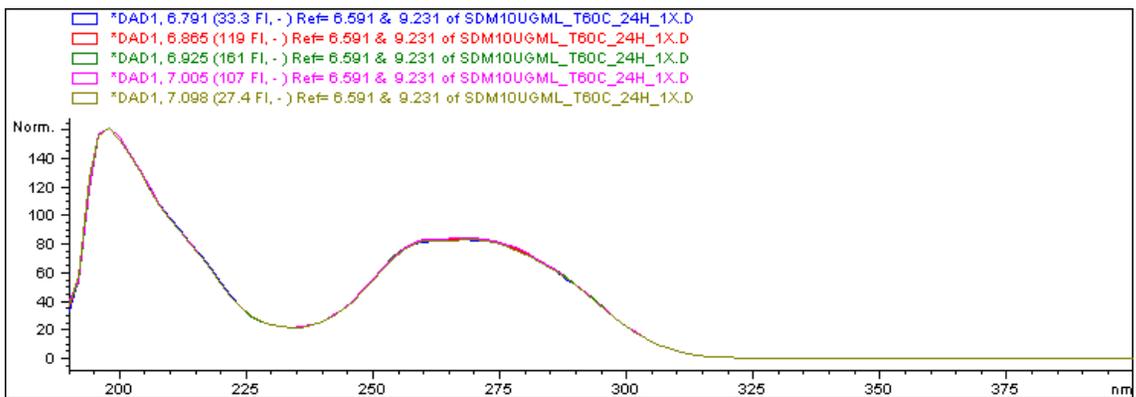


Figura A2. 12. Espectro referente à SDM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em temperatura a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Anexo 3

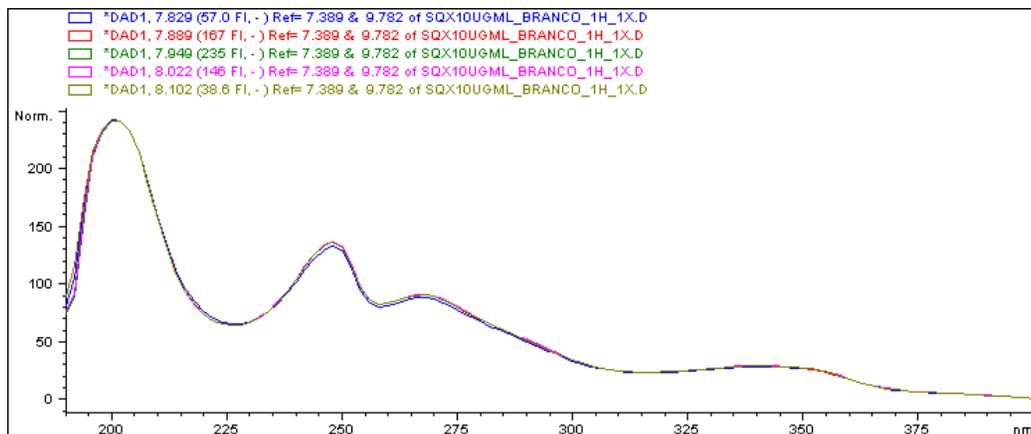


Figura A3. 1. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).

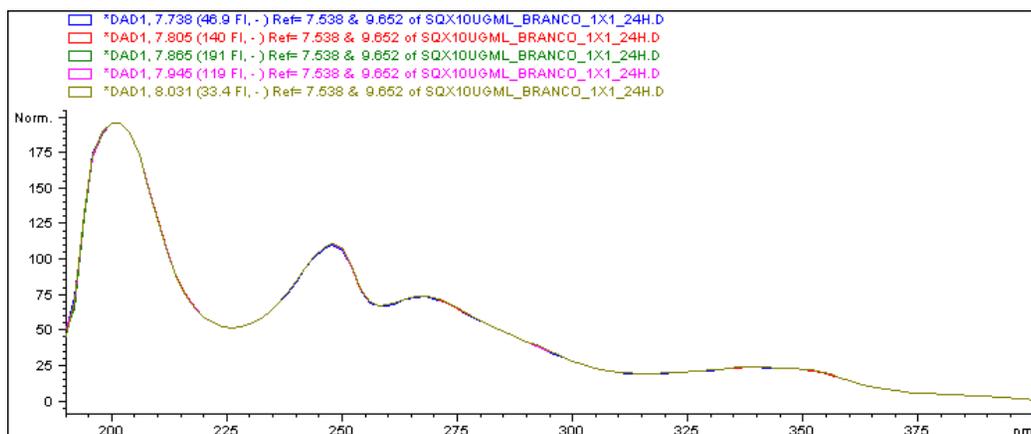


Figura A3. 2. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em fase móvel contendo 20% (v/v) de fase orgânica e 80% (v/v) de fase aquosa (controle).

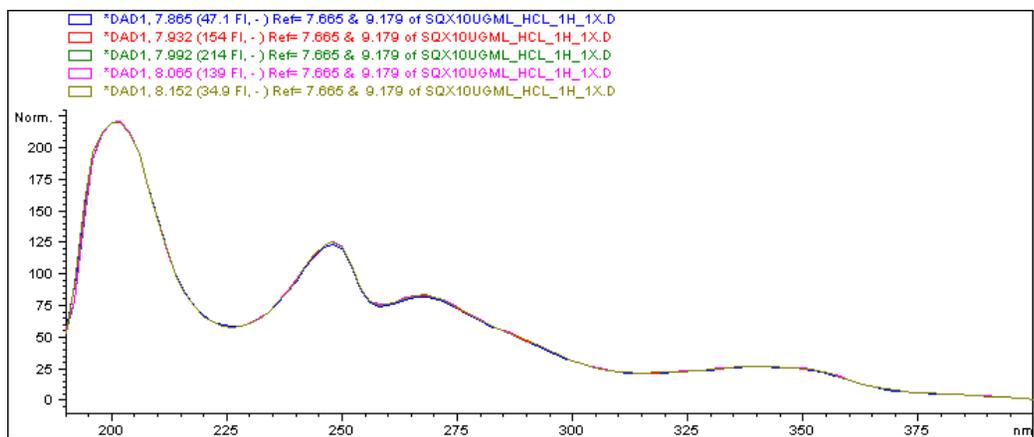


Figura A3. 3. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

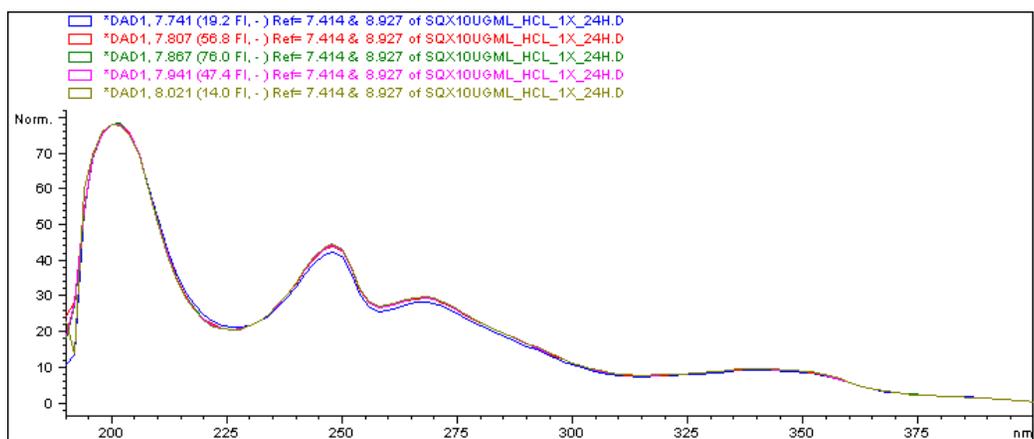


Figura A3. 4. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

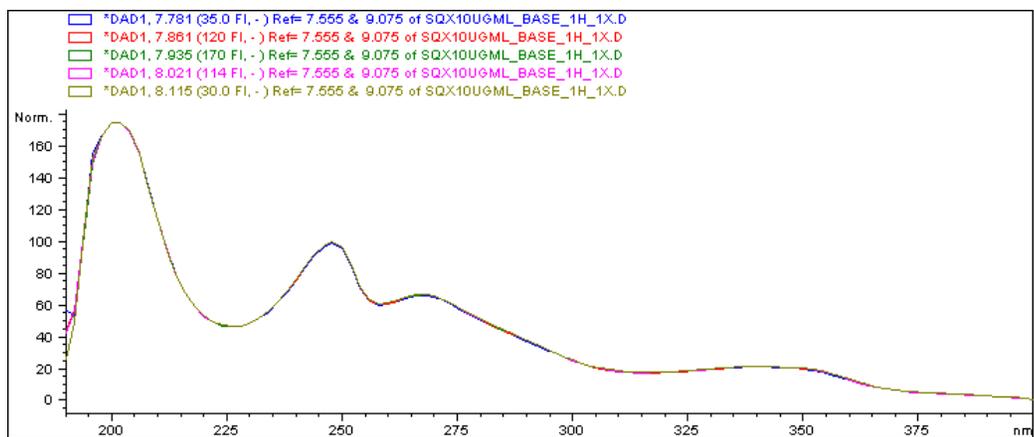


Figura A3. 5. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

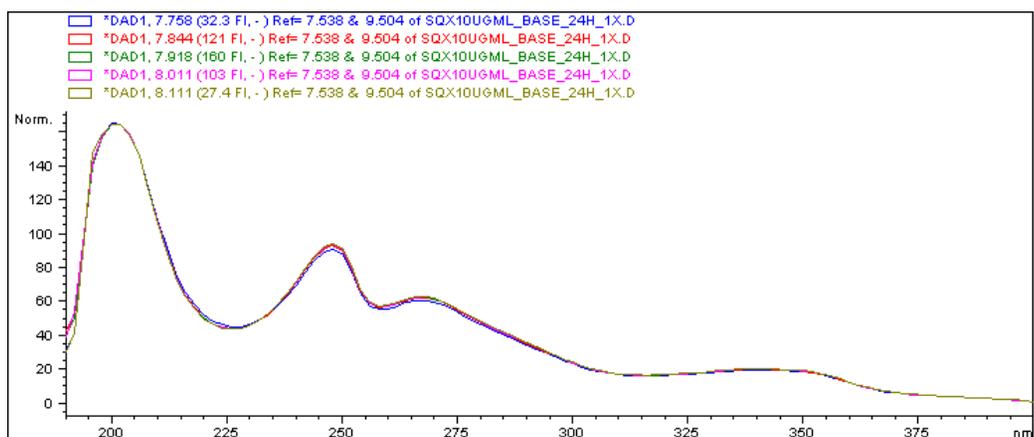


Figura A3. 6. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

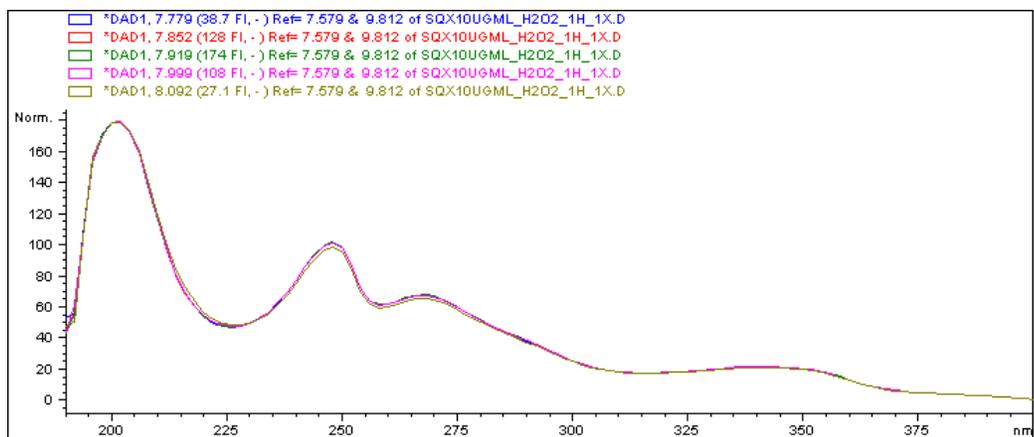


Figura A3. 7. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

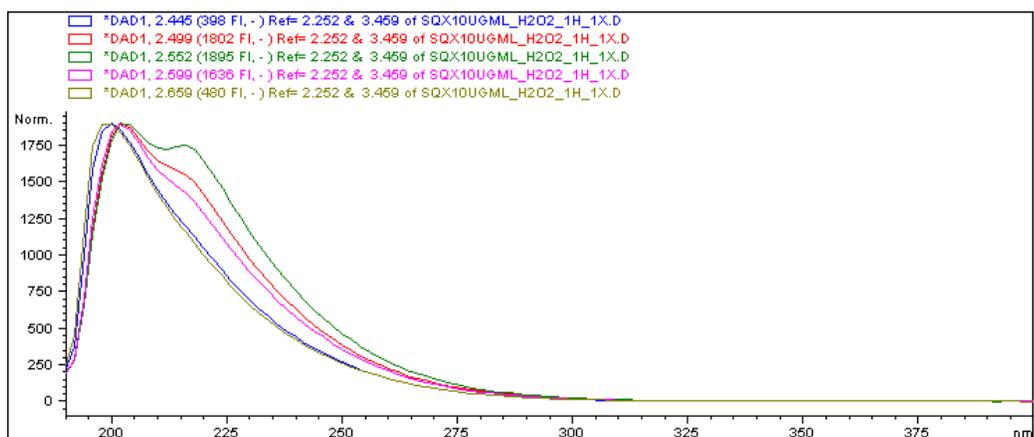


Figura A3. 8. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,549 minutos após uma hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

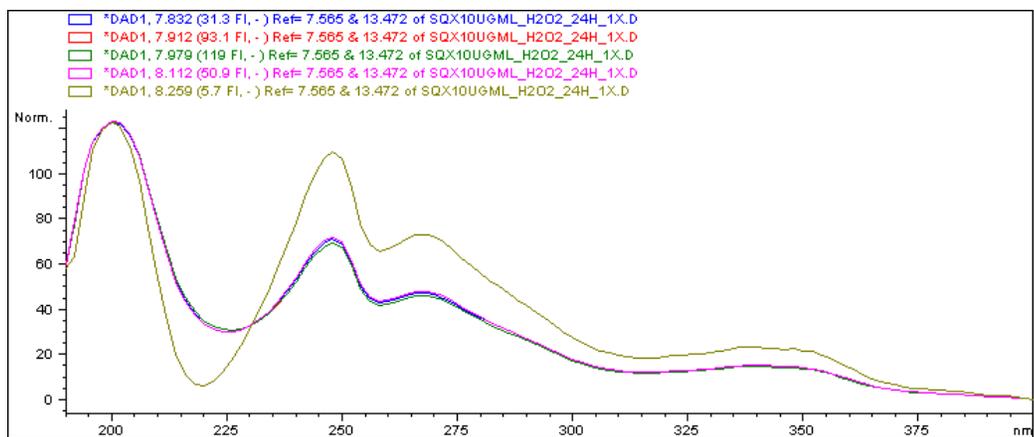


Figura A3. 9. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 hora do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

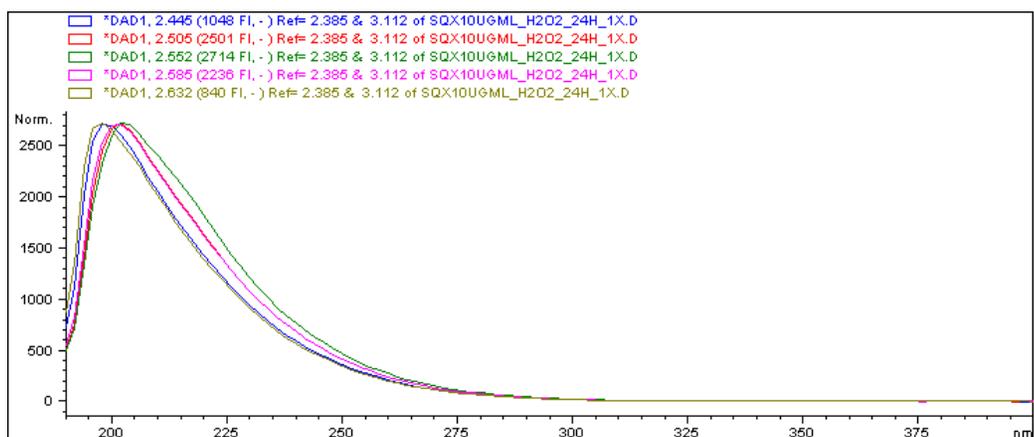


Figura A3. 10. Espectro referente ao pico no tempo de retenção 2,549 minutos após 24 horas do seu preparo em H_2O_2 3% (v/v).

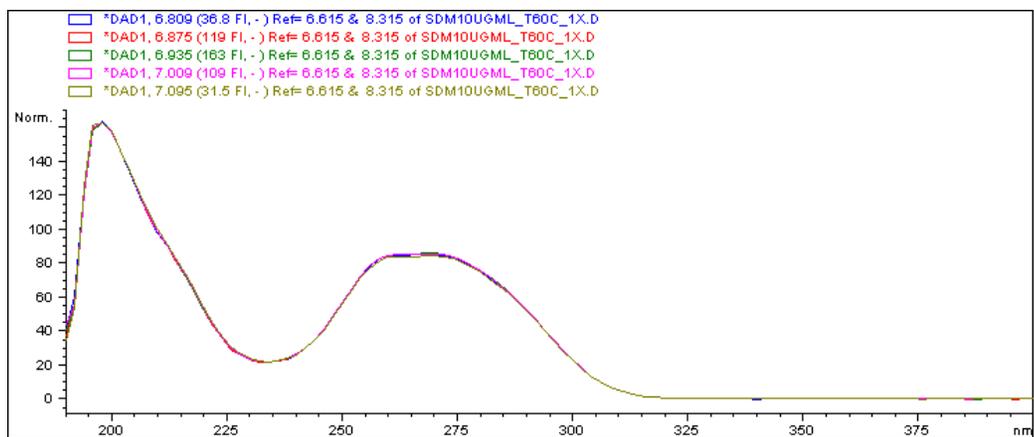


Figura A3. 11. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após uma hora do seu preparo em temperatura a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

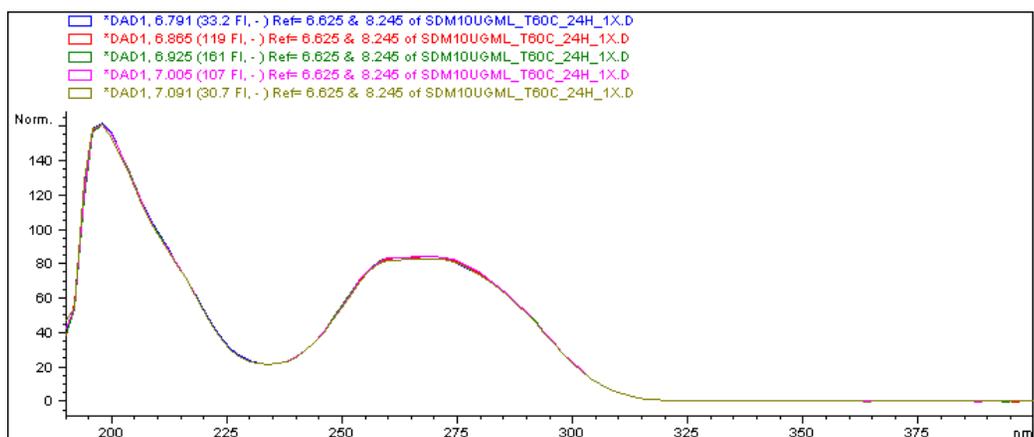


Figura A3. 12. Espectro referente à SQX ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 24 horas do seu preparo em temperatura a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.