



Análise de Sulfonamidas no Mel: Validação e Optimização de um Método de HPLC-Fluorescência

Daniela Matilde Marques Correia

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por

Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

Doutor Miguel José Rodrigues Vilas-Boas

Bragança

2008

Trabalho realizado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projecto “Rastreio Nacional de Antibióticos no mel: Avaliação das vias de contaminação dos resíduos no mel”, financiado pelo Programa Apícola Nacional, e com o apoio da Federação Nacional de Apicultores de Portugal.

Sob a orientação de:

Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

Co-orientação de:

Doutor Miguel José Rodrigues Vilas-Boas

RESUMO

Os antibióticos são usados no tratamento de abelhas com o intuito de combater infecções associadas às doenças da Loque Americana e Loque Europeia que atacam as larvas das abelhas levando à destruição da colmeia. As sulfonamidas são um dos grupos de antibióticos mais usados pelos apicultores. Como a Legislação Europeia, proíbe a comercialização do mel na presença de quaisquer resíduos de antibióticos, a implementação de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação destes resíduos afigura-se uma tarefa fundamental.

O presente trabalho teve como objectivo a optimização, validação e aplicação de um método de HPLC, com detector de fluorescência e derivatização pré-coluna, para a análise de 11 sulfonamidas em amostras de mel: sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxipiridazina, sulfisoxazol, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina e sulfameter (padrão interno). O método de calibração usado foi o de sobreposição de matriz de mel com padrão interno.

A separação foi efectuada numa coluna de fase reversa à temperatura de 32 °C em modo de gradiente usando 2 eluentes preparados com diferentes proporções de tampão acetato (pH 4,0) e acetonitrilo. O tempo da corrida foi de 40 minutos. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão usados foram 405 nm e 495 nm, respectivamente.

A extracção de sulfonamidas das amostras de mel ou de soluções padrão de sulfonamidas com sobreposição de matriz de mel foi efectuada em SPE-C18, após um passo de hidrólise para quebra das ligações entre sulfonamidas e açúcares.

Foram efectuadas calibrações usando soluções padrão de calibração de matriz de mel “claro” e de mel “escuro”, atendendo aos efeitos de matriz de mel obtidos nas sensibilidades das medições analíticas de algumas sulfonamidas.

A linearidade do método para cada sulfonamida foi testada no intervalo de concentrações de 1-100 µg/L. Foi compensado o efeito de matriz pelo uso do método de sobreposição de matriz e da sulfonamida sulfameter como padrão interno. Os limites de detecção e quantificação para cada uma das sulfonamidas analisadas foram da ordem dos 0,4-3 µg/kg e 1-9 µg/kg de mel, respectivamente. O método de HPLC apresentou repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis (CV em geral, inferiores a 5,0% e 15%,

respectivamente). A exactidão do método foi aferida recorrendo a ensaios de recuperação, tendo-se obtido percentagens de recuperação entre 70-120%.

Este método foi aplicado na detecção e quantificação de resíduos de antibióticos em amostras de mel após classificação da cor da amostra em mel “claro” ou mel “escuro”, e os resultados foram comparados com os obtidos pelo método qualitativo CHARM II (método aprovado pelo US-FDA para a análise de resíduos em mel).

ABSTRACT

The antibiotics are used in the treatment of bees to treat infections associated with American Foulbrood and European Foulbrood diseases, that attack the bees larvae taking to the destruction of the beehive. Sulfonamides are one of the groups of antibiotics widely used by the beekeepers. As the European Legislation, prohibit the commercialization of honey in the presence of any residues of antibiotics, the implementation of analytical methods that allow the detection and quantification of these residues is a fundamental task.

The objective of this work was the optimization, validation and application of a HPLC method, with fluorescence detection and pre-column derivatisation, for the analysis of 11 sulfonamides in honey samples: sulfathiazole, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfamethoxypyridazine, sulfisoxazole, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, sulfaquinoxalina and sulfameter (internal standard). The calibration method used was the sobreposition matrix method with internal standard.

The separation was carried out in a reverse phase column at temperature of 32 °C, with gradient using 2 eluents prepared with different proportions of buffer acetate solution (pH 4,0) and acetonitrile. The time of analysis was 40 minutes. The excitation and emission wavelengths were 405 nm and 495 nm, respectively.

The sulfonamides extraction from honey samples or standard solution of sulfonamides prepared with honey sobreposition matrix, was performed with SPE-C18, after an hydrolysis step to liberate the sugar-sulfonamides bounds.

Calibration were made using sulfonamide standard solutions either with “light” honey matrix and “dark” honey matrix, taking into account the honey matrix effects obtained in analytical measurement sensitivities for some sulfonamides.

The linearity of the method for each sulfonamide was tested in the interval of concentrations from 1 to 100 µg/L. The matrix effect was compensated using of the sobreposition matrix method and sulfameter as internal standard. The detection and quantification limits for each analyzed sulfonamides were in the order of 0,4-3 µg/kg and 1-9 µg/kg of honey, respectively. The HPLC method presented acceptable

repeatability and intermediate precision (RSD%, in general, less than 5,0% and 15%, respectively). The method accuracy was checked with recovery assays and giving recovery percentages of 70-120%.

This method was applied in the detection and quantification of antibiotics residues in honey samples after their colour classification, and the results were compared with the ones obtained by the qualitative method CHARM II (approved method for US-FDA for the analysis of residues in honey).

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Luís Dias, meu orientador, por todo o empenhamento, atenção dispensada, disponibilidade, apoio e compreensão a todos os níveis, e também pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor Miguel Vilas-Boas, pela co-orientação deste trabalho, sugestões efectuadas, por todo o apoio, incentivo e disponibilidade.

Ao Prof. António Peres e Prof.^a Ana Cristina Veloso pela amizade, por todo o apoio, sugestões e especialmente pelo incentivo.

Ao Eng. Jorge Sá Morais por estar sempre disponível para ajudar quando surgiam os problemas cromatográficos e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Susana, Elisete e Miguel pela realização das análises da cor do mel.

À Sónia, pela preciosa ajuda na realização de algumas análises e ao João pela boa disposição e espírito positivo.

Às minhas colegas e amigas, Lillian e Soraia por toda a amizade, incentivo, pela paciência com que sempre me ouviram e sobretudo por todos os momentos partilhados.

A todos os meus amigos, especialmente, Ana Paula, Anabela, Sofia e Ivo por toda a amizade e incentivo, por estarem sempre presentes e disponíveis para “tudo” e por todos os bons momentos partilhados.

À minha família: pais, irmãs, cunhados e sobrinhos, pelo incondicional apoio, compreensão e paciência que sempre me dedicaram.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a tornar este momento possível.

A todos o meu “Muito Obrigado”

ÍNDICE GERAL

| | Pág. |
|---|------|
| ÍNDICE DE TABELAS | XI |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XII |
| ABREVIATURAS | XIII |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. SULFONAMIDAS | 2 |
| 1.2. LIMITES PERMITIDOS | 4 |
| 1.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO E ANÁLISE DE SULFONAMIDAS | 5 |
| 1.3.1. TESTE CHARM II | 6 |
| 1.3.2. HPLC | 8 |
| 1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS | 9 |
| 1.5. OBJECTIVOS | 18 |
| | |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 2.1. AMOSTRAGEM | 20 |
| 2.2. MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC | 20 |
| 2.2.1. Substâncias padrão e reagentes | 20 |
| 2.2.2. Equipamento | 21 |
| 2.2.3. Preparação de soluções | 22 |
| 2.2.4. Condições cromatográficas para análise de sulfonamidas | 23 |
| 2.2.5. Identificação das sulfonamidas | 24 |
| 2.2.6. Procedimento de extracção de sulfonamidas em mel | 24 |
| 2.2.7. Procedimento de derivatização de padrões e amostras | 25 |
| 2.3. PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC | 25 |
| 2.3.1. Método de calibração | 26 |
| 2.3.2. Linearidade e sensibilidade | 26 |
| 2.3.3. Limites de detecção e de quantificação | 27 |
| 2.3.4. Selectividade | 27 |
| 2.3.5. Precisão | 28 |
| 2.3.6. Exactidão | 28 |
| 2.4. ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL POR CHARM II E HPLC | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1. Análise de sulfonamidas por CHARM II | 29 |
| 2.4.1.1. Reagentes..... | 29 |
| 2.4.1.2. Equipamento..... | 30 |
| 2.4.1.3. Preparação de soluções | 30 |
| 2.4.1.4. Procedimento experimental..... | 31 |
| 2.4.2. Análise de sulfonamidas por HPLC-Fluorescência..... | 31 |
| | |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 3.1. OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC .. | 33 |
| 3.1.1. Optimização das condições cromatográficas..... | 33 |
| 3.1.2. Identificação das sulfonamidas..... | 35 |
| 3.1.3. Optimização da extracção de sulfonamidas em mel..... | 37 |
| 3.1.4. Optimização da derivatização de padrões e amostras com fluorescamina | 40 |
| 3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC | 41 |
| 3.2.1. Método de calibração | 41 |
| 3.2.2. Linearidade e sensibilidade | 42 |
| 3.2.3. Limites de detecção e de quantificação | 47 |
| 3.2.4. Selectividade..... | 48 |
| 3.2.5. Precisão..... | 50 |
| 3.2.6. Exactidão | 56 |
| 3.3. ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL..... | 59 |
| 3.3.1. Análise de sulfonamidas por CHARM II | 59 |
| 3.3.2. Análise de sulfonamidas por HPLC-Fluorescência..... | 60 |
| | |
| 4. CONCLUSÕES | 63 |
| | |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| | |
| ANEXOS | 72 |
| ANEXO A - PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DA COR EM AMOSTRAS DE MEL..... | 73 |
| ANEXO B - PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL POR CHARM II | 74 |
| ANEXO C - SULFONAMIDAS DETECTADAS PELO TESTE CHARM II E LIMITES DE DETECÇÃO | 87 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabela 2.1. – Quantidades a adicionar de cada solução para preparação de solução tampão acetato para o pH pretendido..... | 23 |
| Tabela 3.1. – Tempos de retenção (TR) obtidos para cada sulfonamida da análise cromatográfica de uma mistura de padrões de sulfonamidas..... | 36 |
| Tabela 3.2. – Parâmetros das rectas de calibração obtidos para cada sulfonamida, em matriz de mel “claro” e determinados pelo método de calibração de padrão interno.... | 44 |
| Tabela 3.3. – Parâmetros das rectas de calibração obtidos para cada sulfonamida, em matriz de mel “escuro” e determinados pelo método de calibração de padrão interno... | 45 |
| Tabela 3.4. – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), expressos em µg/kg de mel da análise de sulfonamidas em mel “claro” e em mel “escuro”..... | 47 |
| Tabela 3.5. – Resultados das áreas dos picos de cada sulfonamida obtidos no estudo da repetibilidade para soluções de controlo de qualidade SCQ 1 e SCQ 2 preparadas com matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro”..... | 51 |
| Tabela 3.6. – Resultados das áreas dos picos de cada sulfonamida obtidos no estudo da precisão intermédia para soluções de controlo de qualidade SCQ 1 e SCQ 2 preparadas com matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro”..... | 54 |
| Tabela 3.7. – Repetibilidade e precisão intermédia do método de análise na quantificação do sulfatiazol em amostras de mel “claro” e de mel “escuro”..... | 55 |
| Tabela 3.8. – Resultados dos ensaios de recuperação usando solução padrão de mistura de sulfonamidas preparadas com matriz de mel “claro” ou matriz de mel “escuro”..... | 57 |
| Tabela 3.9. – Resultados dos ensaios de recuperação do sulfatiazol em mel de matriz de mel “claro” e de matriz de mel “escuro”..... | 58 |
| Tabela 3.10. – Níveis de contaminação de sulfonamidas em amostras de mel analisadas pelo método CHARM II..... | 60 |
| Tabela 3.11. – Resultados obtidos das análises às amostras de mel por HPLC-FL, em função da cor do mel..... | 61 |
| Tabela A.1. – Comparação entre a cor, mm Pfund e Absorvância..... | 73 |
| Tabela C.1. – Sulfonamidas detectadas no mel pelo teste CHARM II e limites de detecção..... | 87 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1.1. – Estruturas químicas das sulfonamidas estudadas | 3 |
| Figura 1.2. – Princípio do teste CHARM II para sulfonamidas | 7 |
| Figura 3.1. – Cromatograma de uma mistura de padrões..... | 36 |
| Figura 3.2. – Rectas de calibração para o sulfatiazol utilizando soluções padrão sem matriz e tendo como base a matriz do “mel claro” ou do “mel escuro” | 43 |
| Figura 3.3. – (i) Cromatograma de uma amostra de mel “claro” não contaminado; (ii) Cromatograma de uma amostra de mel “escuro” não contaminado; (iii) Cromatograma de uma amostra de mel “claro” com adição de padrão..... | 49 |

ABREVIATURAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil)
- C18 – coluna com enchimento C18
- CPM – contagem por minuto
- CV% – coeficiente de variação percentual
- d.i. – diâmetro interno
- DPR% – desvio padrão relativo percentual
- ELISA – “Enzyme linked immuno sorbent assay”
- FL – detector de fluorescência
- GC – cromatografia gasosa (abreviatura de “Gas Chromatography”)
- HPLC – cromatografia líquida de alto desempenho (abreviatura de “High Performance Liquid Chromatography”)
- ICH – “International Conference on Harmonisation”
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (Brasil)
- LC – cromatografia líquida (abreviatura de “Liquid Chromatography”)
- LC-MS/MS – espectrometria de massa “tandem”
- LD – limite de detecção
- LLE – extracção líquido-líquido (abreviatura de “Liquid-Liquid Extraction”)
- LMR – limites máximos de resíduos
- LQ – limite de quantificação
- MS – espectrometria de massa (abreviatura de “Mass Spectrometry”)
- MSPD – dispersão de matriz em fase sólida (abreviatura de “Matrix Solid-Phase Dispersion”)
- PABA – ácido *p*-aminobenzóico
- RPLC – cromatografia líquida em fase reversa (abreviatura de “Reversed-Phase Liquid Chromatography”)
- RSD – desvio padrão relativo (abreviatura de “Relative Standard Desviation”)
- SPE – extracção em fase sólida (abreviatura de “Solid Phase Extraction”)
- TLC – cromatografia de camada fina (abreviatura de “Thin-Layer Chromatography”)
- TR – tempo de retenção
- US-FDA – “United States Food and Drug Administration”
- UV – ultravioleta

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

- 1.1. SULFONAMIDAS
- 1.2. LIMITES PERMITIDOS
- 1.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO E ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS
- 1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
- 1.5. OBJECTIVOS

O mel é um produto natural e saudável, isento de quaisquer impurezas, não sendo permitida a adição de aditivos ou agentes conservantes e de contaminantes. (Reybroeck, 2003; Krivohlavek *et al.*, 2005; Bogdanov, 2006; Debayle *et al.*, 2008). Dos contaminantes de apicultura, com origem nas práticas apícolas, os mais importantes são substâncias usadas para o controlo de doenças nas abelhas (Bogdanov, 2006).

As abelhas melíferas estão sujeitas a um grande número de doenças que afectam o enxame, sendo a Loque Americana e a Loque Europeia as duas doenças bacterianas que afectam mais seriamente as larvas das abelhas. A Loque Americana é uma doença causada pelos esporos da bactéria *Paenibacillus larvae*, que infectam as larvas das abelhas quando estas consomem os esporos de *Paenibacillus* na alimentação, os quais se multiplicam no seu intestino e tecidos, resultando na sua morte. Quando uma colónia é infectada, torna-se severamente contaminada com esporos resistentes, causando a morte da colónia inteira. A Loque Europeia é uma doença causada pela bactéria *Melissococcus plutonius*. Esta bactéria reside no intestino das larvas das abelhas onde compete pelo alimento, levando à morte da larva (Sheridan *et al.*, 2008). Para controlar estas infecções são aplicados frequentemente antibióticos nas colmeias (Zotou e Vasiliadou, 2006; Mohamed *et al.*, 2007), principalmente estreptomicina e sulfonamidas, mas também tetraciclinas e cloranfenicol (Bogdanov, 2006).

1.1.SULFONAMIDAS

As sulfonamidas pertencem à classe dos agentes antimicrobianos e são compostos sintéticos derivados da *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arilo contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (Niessen, 1998;Alaburda *et al.*, 2007). Existem aproximadamente 30 sulfonamidas e as suas estruturas variam na substituição do grupo sulfonamida (Cai *et al.*, 2008). Na Figura 1.1. encontram-se representadas as diferentes estruturas químicas das sulfonamidas estudadas neste trabalho.

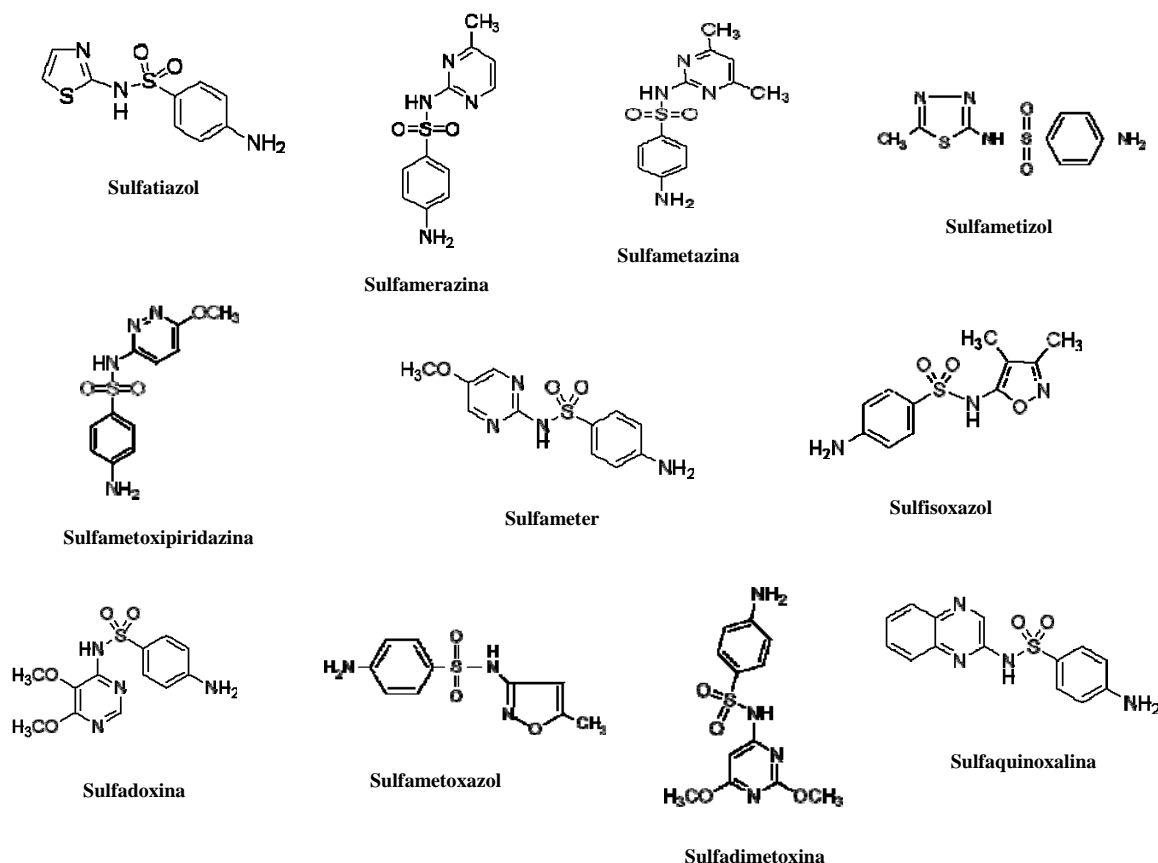


Figura 1.1. - Estruturas químicas das sulfonamidas estudadas (adaptado de <http://www.sigmaaldrich.com>).

As sulfonamidas são substâncias de estrutura análoga à do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e que por serem antagonistas competitivas impedem a sua utilização pelas bactérias, na síntese do ácido fólico, afectando os microrganismos que precisam de sintetizar o seu próprio ácido fólico (Alaburda *et al.*, 2007).

Na apicultura, as sulfonamidas são utilizadas com fins terapêuticos e profiláticos (Stolker e Brinkman, 2005; Wang *et al.*, 2006; Zotou e Vasiliadou, 2006; Cai, *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008), devido ao seu baixo custo e ao seu largo espectro de actividade (Mohamed *et al.*, 2007). Contudo, estes tratamentos conduzem à presença de resíduos de sulfonamidas nos produtos da colmeia, nomeadamente no mel, durante vários anos após a sua aplicação (Maudens *et al.*, 2004; Gallina *et al.*, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2006; Granja, *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2008).

Os resíduos destes compostos, são uma preocupação devido à sua potencial toxicidade, pois os resíduos de sulfonamidas e os seus metabolitos podem causar reacções alérgicas em pessoas sensíveis (Kaufmann *et al.*, 2002; Krivohlavek *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2005), distúrbios no sistema

hematopoiético (Pang *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2007) e efeitos carcinogénicos, demonstrados em ratos (Pang *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2007; Sheridan *et al.*, 2008). Além destes efeitos, os resíduos destas substâncias antibacterianas no mel podem contribuir para um desenvolvimento de resistência nas bactérias patogénicas, reduzindo a efectividade do seu uso como substâncias terapêuticas humanas (Kaufmann *et al.*, 2002; Krivohlavek *et al.*, 2005; Stolker e Brinkman, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2006; Sheridan *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2008).

No entanto, Bogdanov (2006) refere que os resíduos de antibióticos, encontrados no mel, não são muito problemáticos do ponto de vista toxicológico, uma vez que o consumo de mel não é significativo e dado que foram estabelecidos limites mais altos em outros alimentos de origem animal. O problema da presença de antibióticos no mel é mais sério ao nível de comercialização.

1.2. LIMITES PERMITIDOS

De acordo com a legislação europeia (Regulamento CEE 2377/90 e emendas) o uso de antibióticos não é permitido na apicultura e qualquer presença de resíduos no mel impede a sua comercialização (Reyboeck, 2003; Bogdanov, 2006).

Como na União Europeia não existem limites máximos de resíduos (LMR) definidos para sulfonamidas no mel, significa que se as sulfonamidas estiverem presentes, devem estar abaixo do limite de quantificação do método analítico usado (Maudens *et al.*, 2004; Zotou e Vasiliadou, 2006). Alguns países estabeleceram limites de acção ou níveis toleráveis. A Bélgica e o Reino Unido estabeleceram limites de 20 e 50 µg de sulfonamida/kg de mel, respectivamente e a Suíça estabeleceu um limite de 50 µg/kg, para o total de sulfonamidas no mel (sulfonamidas e seus metabolitos) (Maudens *et al.*, 2004; Bogdanov, 2006; Zotou e Vasiliadou, 2006; Mohamed *et al.*, 2007). A França estabeleceu um limite para o sulfatiazol de 10 µg/kg de mel (Maudens *et al.*, 2004).

Na análise de sulfonamidas no mel são usados métodos não harmonizados que mostram sensibilidade e precisão variados. Para uniformizar os laboratórios seria importante estabelecer um limite mínimo de detecção que na maioria dos antibióticos ronda os 10 µg/kg de mel (Bogdanov, 2006).

1.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO E ANÁLISE DE SULFONAMIDAS

Para monitorizar resíduos de sulfonamidas em mel foram desenvolvidos métodos como: microbiológicos (Krivohlavek *et al.*, 2005), colorimétricos (Maudens, *et al.*, 2004; Thompson e Noot, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2006; Zou *et al.*, 2008), ensaios imunoenzimáticos como ELISA (“Enzyme linked immuno sorbent assay”) (Maudens, *et al.*, 2004; Thompson e Noot, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2006; Mohamed *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2008), ensaios com receptores imunoradioactivos (comercialmente disponível como teste CHARM II) (Maudens, *et al.*, 2004), cromatografia de camada fina (TLC) (Maudens, *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2005; Thompson e Noot, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2006; Zou *et al.*, 2008), cromatografia gasosa (GC) (Maudens, *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2007) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em fase reversa (Maudens, *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2006).

Estes métodos analíticos podem ser separados em métodos de despiste e em métodos de quantificação. Os métodos de despiste como os microbiológicos, teste CHARM II, ensaios imunoenzimáticos e TLC são rápidos e baratos mas, podem dar resultados “falsos positivos” (Krivohlavek *et al.*, 2005). São métodos eficientes na detecção de classes inteiras de compostos, mas não conseguem diferenciar os compostos dentro de uma classe (Sheridan *et al.*, 2008).

Os métodos quantitativos, como cromatografia gasosa e cromatografia líquida (LC), em combinação com detecção por espectrometria de massa (MS) podem ser usados para confirmação (Krivohlavek *et al.*, 2005).

Bogdanov (2006) aconselha efectuar as análises de rotina de antibióticos em dois passos. No primeiro passo usar o teste de CHARM ou ELISA para separar as amostras de mel com contaminação em sulfonamidas (resultados positivos) e no segundo passo, o HPLC ou LC-MS para identificar e quantificar as sulfonamidas presentes nas amostras de mel contaminadas. Neste trabalho usou-se o teste CHARM II e o HPLC com detecção por fluorescência (HPLC-FL).

1.3.1. TESTE CHARM II

O teste CHARM II foi desenvolvido pela Charm Sciences Inc. USA. É um método utilizado internacionalmente e aprovado pela US-FDA (“United States Food and Drug Administration”). É um método de despiste usado para diferentes matrizes alimentares como a carne e o leite, o qual foi adaptado para testar o mel. Este teste é baseado na ligação específica de antibióticos a receptores. A detecção é determinada pela medição da radioactividade de ^3H ou ^{14}C e pode detectar uma classe inteira de antibióticos.

O teste CHARM II é um método que permite determinar a presença acumulativa de compostos de uma dada família de antibióticos no mel. Os grupos de antibióticos no mel que são possíveis de analisar por este método são: sulfonamidas, tetraciclina, beta-lactâmicos, macrólidos, anfencóis e aminoglicosídeos (estreptomicina) (Salter, 2003).

O CHARM II é um sistema baseado na detecção por cintilação para famílias de resíduos químicos, utilizando receptores específicos ou um anticorpo em ensaios “imunoligados” ^3H ou ^{14}C (conforme o tipo de análise) como partículas localizadoras (Figura 1.2.). Os resultados são contagens numéricas (Salter, 2003).

Resumidamente, o procedimento analítico corresponde à adição de reagentes (reagentes específicos para cada classe de antibióticos) à amostra de mel extraída e SPE-C18, de forma sequencial e competitiva a várias temperaturas de incubação (otimizadas para a detecção de cada grupo de antibióticos). A reacção de detecção é parada por centrifugação sendo a “partícula localizadora” não ligada separada do complexo partícula localizadora-anticorpo receptor. A mistura (complexo partícula localizadora-anticorpo receptor) é analisada num analisador com contagem por cintilação durante 1 minuto. As amostras com contagem por minuto (CPM) elevada são consideradas negativas enquanto, amostras com contagens baixas são consideradas positivas. O resultado da análise corresponde à indicação de presença/ausência da classe de antibióticos na amostra de mel. Para isso usa-se um ponto de controlo que é um número determinado a partir de uma referência negativa ou uma amostra com contaminação adicionada, conforme o tipo de ensaio. Amostras com contagens superiores ao ponto de controlo são consideradas negativas para a presença do grupo de antibióticos em análise, enquanto, amostras com contagens iguais ou inferiores são consideradas suspeitas da presença desses antibióticos. Os pontos de controlo são baseados nos limites de detecção para cada grupo de antibióticos, apresentando

sensibilidades comparáveis às técnicas cromatográficas como HPLC ou LC-MS (Bogdanov, 2003; Salter, 2003).

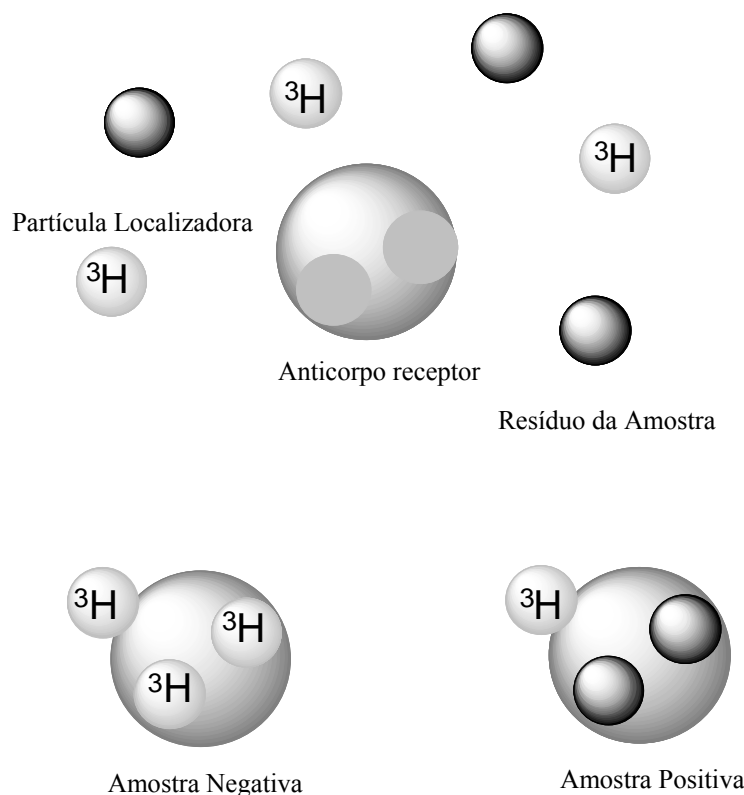


Figura 1.2. – Princípio do teste CHARM II para sulfonamidas.

Os limites de detecção são baseados no composto específico utilizado na análise do controlo positivo de cada grupo de antibióticos (Bogdanov, 2003; Salter, 2003). O limite de detecção na análise de sulfonamidas no mel é baseado no limite de detecção para a sulfametazina, que é de 10 µg/kg de mel.

O despiste pelo teste CHARM II exclui as amostras negativas. As amostras positivas devem ser confirmadas por outros métodos (HPLC, LC-MS). A taxa de amostras classificadas correctamente como positivas depende da experiência do laboratório. Assim, 30% das amostras testadas como positivas serão confirmadas por outros métodos. Os testes efectuados para alguns antibióticos (por exemplo estreptomicina) são mais seguros do que para outros antibióticos (por exemplo sulfonamidas). Foi

descoberto que o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), um constituinte natural do mel, pode influenciar o teste para sulfonamidas e dar resultados “falsos positivos”. Existe ainda, o efeito de matriz, especialmente em “mel de melada” e mel de castanheiro, os quais conduzem a um aumento da taxa de amostras de mel “falsos positivos” (Bogdanov, 2003). Globalmente, o teste CHARM II para o mel é uma ferramenta valiosa para testes de rotina para produtores de mel e embaladores. As principais vantagens desta técnica são:

- rapidez e capacidade de testar um grupo inteiro de antibióticos e seus metabolitos ao mesmo tempo;
- consideravelmente barato quando comparado com outros métodos quantitativos (Bogdanov, 2003).

1.3.2. HPLC

O HPLC tem sido um dos métodos analíticos mais usados para determinar sulfonamidas no mel (Krivohlavek *et al.*, 2005; Thompson e Noot, 2005; Zou *et al.*, 2008). Os detectores utilizados podem ser ultravioleta (UV) (Krivohlavek *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2007), “diode array” (Krivohlavek *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2007), fluorescência (Zotou e Vasiliadou, 2006) e espectrometria de massa (MS) (Krivohlavek *et al.*, 2005; Zotou e Vasiliadou, 2006; Mohamed *et al.*, 2007). Estes métodos instrumentais permitem obter limites de detecção baixos e a identificação dos compostos dentro de uma classe pelo seu tempo de retenção (Sheridan, *et al.*, 2008). A LC com detector de espectrometria de massa (LC-MS) tem mais vantagens, pois, além de quantificar, permite obter uma confirmação estrutural dos resíduos de sulfonamidas (Zou *et al.*, 2006). Hoje em dia, “tandem mass spectrometry” (LC-MS/MS) é a técnica preferencial uma vez que aumenta a selectividade e sensibilidade quando comparada com outras técnicas (Sheridan *et al.*, 2008).

Neste estudo, foi utilizado o HPLC com detecção por fluorescência. A maior parte das substâncias não tem fluorescência intrínseca, por isso, para a detecção de compostos não fluorescentes as substâncias a serem detectadas têm que ser derivatizadas (Kellner *et al.*, 1998). A derivatização dos compostos pode ser efectuada pré ou pós-coluna, sendo a fluorescamina, o reagente de derivatização mais utilizado para as sulfonamidas.

Os limites de detecção para sulfonamidas com detecção por fluorescência são aproximadamente de 5 µg/kg de mel, os limites de quantificação variam entre 10-15

µg/kg de mel e a recuperabilidade destas substâncias variam de 70 a 100% (Bogdanov, 2003).

Devida à complexidade do mel, a extracção de sulfonamidas em mel exige incluir um pré-tratamento da amostra (as sulfonamidas encontram-se ligadas a açúcares no mel, sendo necessário efectuar uma hidrólise), uma extracção das sulfonamidas, bem como, o processo de derivatização antes de ser analisada por HPLC-FL (Bogdanov, 2003). Os processos de extracção referenciados na bibliografia são: extracção líquido-líquido (LLE), extracção em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), entre outros (Zotou e Vasiliadou, 2006; Zou *et al.*, 2008).

A cor do mel é um parâmetro físico-químico relacionado com a origem floral do mel, com o conteúdo em minerais, pólen e compostos fenólicos (Bertoncelj *et al.*, 2007). Neste método, a cor do mel mostrou ser significativa no estudo da optimização e validação do método de HPLC. A cor do mel pode ser baseada numa comparação óptica usando uma escala simples de cor após medição usando escala de cor Pfund ou comparadores “Lavibond” (Bogdanov *et al.*, 2004). Bianchi desenvolveu um método de análise espectrofotométrico, no qual se efectua uma correspondência entre a absorvância medida e a escala de Pfund (Montenegro *et al.*, 2005).

Em suma, o HPLC é um bom método de rotina, onde antibióticos conhecidos são identificados e quantificados.

As desvantagens deste método são:

- cada classe de antibióticos tem que ser analisada separadamente;
- não há 100% de certeza relativa à identificação segura dos antibióticos (Bogdanov, 2003).

1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA), “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. Ou seja, com a finalidade de confirmar que os métodos usados num laboratório são adequados para o uso pretendido, devem ser validados métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos fins para que foram elaborados ou que sofreram modificações. Os estudos de validação

envolvem a avaliação de características de desempenho do método em condições experimentais definidas de forma a garantir a sua aplicabilidade ao nível do intervalo de concentrações e tipos de amostras. Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação são: selectividade, linearidade e intervalo dinâmico, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exactidão e robustez (Ribani *et al.*, 2004).

Selectividade.

A selectividade avalia a capacidade de um método analítico medir a substância a analisar na presença de componentes como impurezas, produtos de degradação, ou outros compostos que possam estar presentes na matriz da amostra. Uma forma de avaliar a selectividade num método analítico de HPLC é comparar uma amostra com matriz isenta da substância a analisar com uma amostra onde a substância a analisar foi adicionada (adição de padrão). Com este estudo pretende-se verificar se nenhum interferente tem eluição no tempo de retenção da substância de interesse, que deverá estar bem separada dos restantes compostos da amostra (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

Linearidade e intervalo dinâmico.

A linearidade de um procedimento analítico de HPLC corresponde à capacidade de fornecer resultados instrumentais, proporcionais à concentração da substância a analisar na amostra através de uma relação linear. A linearidade é melhor avaliada por inspecção visual de um gráfico onde se representam os sinais de resposta (área dos picos) em função da concentração da substância a analisar em soluções padrão. Os parâmetros da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados (o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação) traduzem a relação linear dos dados experimentais, permitindo extrair informação sobre o método analítico. O coeficiente de correlação dá informação sobre a qualidade da curva obtida, indicando menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos parâmetros da regressão linear, quanto mais próximo o valor for de 1,0. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado um ajuste ideal dos dados na regressão linear. A sensibilidade, que é um parâmetro que traduz a variação da resposta em função da concentração da substância a analisar, pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração

(declive), que depende da natureza da substância a analisar e da técnica de detecção utilizada. Do estudo da linearidade define-se o intervalo dinâmico do método, que corresponde ao intervalo de concentrações das soluções padrão de calibração onde o sinal mostra dependência linear, estando também dependente dos limites de detecção e quantificação, bem como, dos níveis de concentração da substância a analisar nas amostras. O limite superior do intervalo dinâmico, em geral, é o limite da linearidade que depende do sistema de resposta do equipamento de medição mas, que pode ser também definido em função dos níveis de concentração da substância a analisar nas amostras. A quantificação do composto a analisar pode ser obtida através dos seguintes métodos de calibração: *i)* padrões externos; *ii)* padrão interno; *iii)* sobreposição da matriz; *iv)* adição de padrão (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

i) Calibração com padrões externos.

No método de calibração com padrões externos prepara-se uma série de soluções padrão da substância a ser analisada com diferentes concentrações; os cromatogramas das soluções padrão são obtidos e as áreas dos picos são relacionadas, numa representação gráfica, com as concentrações da substância e, por regressão linear, traduzidas por uma equação de recta. A área do pico da substância a ser analisada na amostra é, posteriormente, comparada com os resultados das soluções padrão de calibração para determinação da concentração. Este método é sensível a erros de preparação e de injeção das soluções (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

ii) Calibração com padrão interno.

O método de calibração com padrão interno consiste na preparação das soluções padrão da substância a analisar em diversas concentrações conhecidas, às quais se adiciona um composto denominado padrão interno de concentração constante, o qual não existe na amostra. Após análise destas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/ área do padrão interno) em função da concentração da substância. À amostra também se adiciona a mesma quantidade de padrão interno. Após análise da amostra diluída, através da razão de áreas obtidas no cromatograma obtém-se a concentração da substância na amostra. O padrão interno deve ser um composto similar à substância a ser quantificada, não reagir com a substância ou outra espécie da matriz, não fazer parte da amostra e, na análise por HPLC, ter um tempo de retenção que permita estar separada e com boa resolução, de

todas as outras substâncias presentes na amostra (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

iii) Calibração com sobreposição de matriz.

O método de sobreposição de matriz consiste na adição do padrão da substância a analisar em diversas concentrações a uma matriz semelhante à da amostra ou mesmo em matriz da amostra isenta da substância a analisar. O gráfico de calibração relaciona as áreas dos picos obtidas com as concentrações dos padrões da substância. O método de sobreposição da matriz pode ser utilizado em simultâneo com o método de calibração de padrões externos ou de padrão interno. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferências no método analítico mas, também de grande importância quando a matriz da amostra pode interferir no desempenho de passos experimentais, como por exemplo, pré-concentração, extração e separação.

Na análise de amostras, nas quais pode ocorrer o efeito da matriz e não se tem disponível uma matriz isenta da substância a analisar para utilizar o método de sobreposição da matriz, deve-se utilizar o método de calibração por adição de padrão (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

iv) Calibração por adição padrão.

O método de calibração por adição de padrão consiste na preparação de soluções de mistura de uma solução padrão da substância a analisar em diversas concentrações e da amostra, em quantidades constantes. Estas amostras com adição de padrão são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as áreas dos picos da substância em função das quantidades da substância adicionada à amostra (padrão). O ponto onde a recta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está a ser determinada, sem qualquer adição do padrão. O método de adição padrão é trabalhoso, mas importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse. Este método é usado como recurso final quando não se pode usar o método de calibração com padrões externos e padrão interno (usados quando não se suspeita que a matriz da amostra cause erros sistemáticos) e o método de calibração com sobreposição da matriz (usado para compensar o efeito da matriz). Globalmente, os

métodos de quantificação devem ser seleccionados de forma a fornecer a melhor exactidão e precisão possível (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

Limite de detecção (LD).

O limite de detecção é a concentração mínima da substância a analisar que pode ser detectada pelo método com precisão e exactidão adequadas e pode ser calculado baseado em parâmetros da curva analítica. A expressão seguinte permite determinar o limite de detecção:

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{s}{m} \right) \quad (1)$$

onde: s é o desvio padrão da resposta, que pode ser o desvio padrão do branco, da ordenada da origem da equação da recta ou da equação da recta da regressão linear; m é o declive ou coeficiente angular da curva analítica. Estes dados são obtidos da curva de calibração usando soluções padrão de calibração com matriz semelhante ou igual às das amostras e com concentrações da substância a analisar próximas do limite de detecção (Ribani *et al.*, 2004).

Limite de quantificação (LQ).

O limite de quantificação é a menor concentração da substância a analisar que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exactidão. O LQ é calculado usando os mesmos parâmetros definidos no cálculo do limite de detecção:

$$LQ = 10 \times \left(\frac{s}{m} \right) \quad (2)$$

Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exactidão e precisão obtidas são satisfatórias (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

Precisão.

A precisão avalia a dispersão de resultados de uma série de medições repetidas a uma mesma amostra, a amostras semelhantes ou a uma solução padrão, em condições definidas. É normalmente avaliada usando o valor do desvio padrão relativo (DPR%, também conhecido como coeficiente de variação, CV%), em circunstâncias específicas de medição, como a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade.

$$\text{DPR}(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde, s é o desvio padrão absoluto e \bar{x} é a média aritmética das medições.

Normalmente, métodos que determinam substâncias em macro quantidades requerem um DPR% de 1 a 2%. Em métodos de análise de quantidades residuais, aceitam-se DPR% até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani *et al.*, 2004). Os critérios experimentais usados na avaliação da precisão são a seguir referidos para: *i*) repetibilidade; *ii*) precisão intermédia; *iii*) reprodutibilidade.

i) Repetibilidade.

A repetibilidade avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas usando o mesmo método sob as mesmas condições de medição, ou seja, usando o mesmo procedimento, com o mesmo técnico e equipamento analítico e usando as mesmas condições experimentais do mesmo laboratório. As repetições devem ser realizadas num curto intervalo de tempo. Para o estudo da repetibilidade, o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, enquanto que a “International Conference on Harmonisation” (ICH) e ANVISA sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações para três níveis de concentrações (três repetições cada) ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração próxima do valor esperado (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

ii) Precisão intermédia.

A precisão intermédia é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Avalia o efeito das variações dentro do laboratório associadas a medições em diferentes dias ou com diferentes analistas ou com diferentes

equipamentos ou com uma combinação destes factores. Para determinar a precisão intermédia de um método, efectua-se “n” medições de uma solução amostra e padrões, de vários níveis de concentração, em vários dias (de acordo com o número de ensaios descritos na medição da repetibilidade). A precisão intermédia é também avaliada através do valor do desvio padrão relativo (DPR%) dos resultados das análises repetidas nas condições acima referidas (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

iii) Reprodutibilidade.

A reprodutibilidade mede a precisão entre laboratórios, como nos estudos de colaboração entre laboratórios, e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos (Ribani *et al.*, 2004). Para validar esta característica experimental, estudos semelhantes devem ser efectuados em laboratórios diferentes usando o mesmo lote da amostra homogénea e o mesmo desenho experimental para a validação do mesmo método analítico. Este estudo corresponde ao grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra efectuadas sob diferentes condições (por exemplo, diferentes técnicos, laboratórios, equipamentos, etc.).

Exactidão.

A exactidão averigua a proximidade entre o resultado de um ensaio e o seu valor de referência aceite como verdadeiro. A exactidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, está dependente de erros sistemáticos. A ICH recomenda avaliar a exactidão com um mínimo de nove determinações e contendo no mínimo três níveis de concentração definidos de forma a abranger um intervalo estabelecido. Os processos mais utilizados para avaliar a exactidão de um método são: *i)* amostras de referência; *ii)* comparação de métodos; *iii)* ensaios de recuperação; *iv)* adição padrão (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

i) Amostras de referência certificadas.

As amostras de referência são adquiridas com um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância e uma incerteza associada. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis. Os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de repetições da análise à substância de interesse) à amostra padrão devem ser

comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exactidão do método (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

ii) Comparação de métodos.

A comparação de métodos tem como objectivo, comparar resultados obtidos utilizando o método em desenvolvimento e os resultados adquiridos através de um método de referência. O grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos é avaliado pela exactidão do método testado em relação ao de referência. As análises são efectuadas utilizando os dois métodos (o método em desenvolvimento e o método de referência), sobre as mesmas amostras com repetições, num intervalo de concentrações em que se pretende validar o método (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

iii) Ensaio de recuperação.

A recuperação (ou factor de recuperação) é definida como a relação da quantidade da substância a analisar que é extraída e passível de ser quantificada em função da quantidade presente ou adicionada (valor conhecido). No processo de adição, em geral, usa-se uma solução padrão da substância a analisar que é adicionada à matriz similar à amostra (branco) isenta da substância ou à amostra (fortificação, incorporação, termos provenientes do inglês “spiking”). Pelo facto de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser estudados.

Dois pontos a ter em consideração neste procedimento de recuperação são que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra e é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Por este motivo, a recuperação deve ser avaliada no intervalo de concentrações esperado para a substância a analisar nas amostras. Este estudo pode ser realizado a três níveis de concentração por adição da substância padrão: próximo do limite de quantificação, próximo da concentração média e próximo da concentração máxima do intervalo dinâmico usado no método analítico.

A recuperação é calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde:

$C1$ = concentração determinada na amostra adicionada,

$C2$ = concentração determinada na amostra não adicionada,

$C3$ = concentração adicionada.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com desvio padrão relativo até 20%. Porém, dependendo da complexidade do método analítico e da matriz da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com desvio padrão relativo até 15% (Ribani *et al.*, 2004).

iv) Adição de padrão.

Quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância a analisar, deve-se usar o método de calibração por adição de padrão. A descrição deste método já foi referida no estudo da linearidade no ponto *iv) Calibração por adição padrão.*

Robustez.

A robustez de um método analítico é a medida da capacidade do método em se manter inalterável no seu desempenho analítico face a pequenas variações nos seus parâmetros experimentais. Ou seja, um método diz-se robusto se for praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas neste estudo reflectem as possíveis alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

1.5. OBJECTIVOS

O mel é um produto natural pelo que a sua comercialização está sujeita à Legislação Europeia, que proíbe a sua comercialização na presença de quaisquer resíduos de antibióticos. Estes são usados pelos apicultores no tratamento de doenças das abelhas.

As sulfonamidas são um dos grupos de antibióticos mais usados pelos apicultores de Portugal. Deste modo, a implementação de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação destes resíduos afigura-se uma tarefa fundamental.

Este trabalho tem assim por objectivos:

- Optimizar e validar um método de HPLC para a análise de sulfonamidas em amostras de mel;
- Detectar e quantificar os resíduos de antibióticos em amostras de mel;
- Comparar os resultados com os obtidos pelo método qualitativo CHARM II (método aprovado pela US-FDA para a análise de resíduos em mel).

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

- 2.1. AMOSTRAGEM
- 2.2. MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC
- 2.3. PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC
- 2.4. ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL POR CHARM II E HPLC

Neste capítulo apresenta-se a descrição da amostragem efectuada, bem como, os reagentes, o equipamento, os procedimentos e as condições experimentais usadas nos métodos aplicados na análise de sulfonamidas no mel. Referem-se ainda os vários parâmetros analíticos avaliados na validação do método analítico de HPLC que foi desenvolvido para analisar as sulfonamidas no mel.

2.1. AMOSTRAGEM

As amostras de mel foram fornecidas por 31 Associações de Apicultores no âmbito do projecto “Rastreio Nacional de Antibióticos no mel” financiado pelo Programa Apícola Nacional, e que tinha como objectivo analisar as amostras de mel por CHARM II (permite analisar de forma qualitativa a presença de sulfonamidas nas amostras de mel) e nos casos de resultados positivos em sulfonamidas, efectuar a confirmação, identificação e análise quantitativa por HPLC. Foram recolhidas amostras ao longo de 3 anos apícolas consecutivos (2005-2007) e foram analisadas um total de 397 amostras provenientes de quase todas as regiões de Portugal.

2.2. MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC

Descrevem-se, a seguir, as substâncias padrão e reagentes usados, os equipamentos utilizados, o modo de preparação de soluções, bem como, as condições cromatográficas, o procedimento de extracção das sulfonamidas em amostras de mel e o procedimento de derivatização dos padrões e amostras.

2.2.1. Substâncias padrão e reagentes

Os padrões de sulfonamidas utilizados foram os seguintes: sulfamerazina, sulfametazina, sulfisoxazol e sulfadimetoxina (Sigma-Aldrich), com uma pureza $\geq 99\%$; sulfatiazol (Fluka), com uma pureza de 98% ; sulfametizol, sulfadoxina, sulfametoxazol e sulfameter (padrão interno) (Vetranal – Riedel de Häen), com uma pureza de $99,9\%$; sulfametoxipiridazina (Vetranal – Riedel de Häen), com uma pureza de $99,8\%$; sulfaquinoxalina (Pestanal – Riedel de Häen), com uma pureza de $97,2\%$.

Os solventes acetonitrilo, metanol e acetona utilizados foram de qualidade HPLC, grau de pureza superior a 99,8% e da marca Lab-Scan. O ácido acético glacial utilizado foi adquirido à Panreac. A água desionizada foi obtida através de um sistema de desionização TGI Pure Water Systems.

O acetato de sódio tri-hidratado, de qualidade PA, foi adquirido à Panreac e a fluorescamina, com um grau de pureza de 98%, à Aldrich.

Para a extracção das amostras de mel foram usadas colunas SPE-C18 de 500 mg e 3 mL, Bond Elut da Varian.

Todos os eluentes foram filtrados usando membranas de nylon de porosidade 0,20 µm e diâmetro 47 mm da Millipore. Todas as amostras e padrões injectados foram previamente filtrados com filtro de nylon de porosidade 0,2 µm e diâmetro 25 mm, Puradisc 25 NYL da Whatman.

2.2.2. Equipamento

As análises foram efectuadas num sistema cromatográfico constituído por: bomba Knauer, modelo Smartline Pump 1000; desgaseificador Knauer, modelo Smartline Manager 5000; injector automático Jasco, modelo AS-2057 e detector de Fluorescência Jasco, modelo FP-2020 Plus. Na separação cromatográfica usou-se uma coluna do tipo Vertex, ProntoSIL 120-5 C18 SH, (150 x 4,6 mm d.i.) com pré-coluna incluída, da Knauer. A coluna foi colocada no interior de um forno de marca Grace, modelo 7971R. Na aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o software Clarity, versão 2.4 da DataApex.

Para testar o pH das soluções tampão utilizou-se um medidor de pH de marca Hanna Instruments, modelo pH 211 Microprocessor pH Meter. Na filtração dos eluentes utilizou-se um sistema de filtração em vidro, de marca Phenomenex. Na desgaseificação dos eluentes e preparação das amostras utilizou-se um banho de ultra-sons, marca Elma modelo Transsonic 460/H.

A pesagem das amostras e padrões foi efectuada numa balança analítica, marca AE modelo AAA 160L, com precisão de 0,1 mg.

Na extracção das amostras em SPE foi utilizado um sistema Manifold, Macherey-Nagel Chromabond, com capacidade de extracção de 24 amostras em simultâneo e uma bomba de vácuo Charles Austen Pumps modelo DA7C. Na derivatização das amostras e

padrões foi utilizada uma incubadora de marca CHARM modelo CHARM Inctronic 2™ e na agitação das amostras foi usado um agitador vortex Cat modelo VM2.

2.2.3. Preparação de soluções

A seguir, descreve-se o modo de preparação das: *i)* soluções padrão de sulfonamidas; *ii)* soluções tampão; *iii)* eluentes para HPLC; *iv)* soluções para extração e derivatização das sulfonamidas.

i) Preparação de soluções padrão de sulfonamidas

Foram preparadas soluções mãe de 1 mg/mL de cada padrão de sulfonamidas em acetonitrilo. As sulfonamidas usadas foram: sulfamerazina, sulfametazina, sulfisoxazol, sulfadimetoxina sulfametizol, sulfadoxina, sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfaquinoxalina e sulfameter (padrão interno). Cada solução foi preparada tendo em conta a pureza das substâncias comerciais. Posteriormente, preparou-se uma solução mistura de padrões de sulfonamidas com uma concentração de 1 µg/mL, a partir das soluções mãe de cada sulfonamida (excepto padrão interno). Com a solução mistura de sulfonamidas anterior prepararam-se, por diluição, soluções padrão numa gama de concentrações entre 1 e 100 ng/mL. As concentrações mais baixas (abaixo de 20 ng/g) foram preparadas a partir de uma solução mistura de padrões de sulfonamidas de 30 ng/mL.

Para o padrão interno foi preparada uma solução de 1 µg/mL, a partir da solução mãe da sulfonamida sulfameter de 1 mg/mL, por diluição. Foi ainda preparada uma solução de 100 ng/mL, por diluição, a partir da solução de 1 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em acetonitrilo e foram armazenadas no escuro a -20 °C, até serem utilizadas.

ii) Preparação de soluções tampão

As soluções tampão de acetato 0,1 M foram preparados usando diferentes volumes de solução de ácido acético (solução I) e de acetato de sódio (solução II), de acordo com o apresentado na Tabela 2.1. A solução I foi preparada medindo 5,8 mL de ácido acético glacial em 1 L de água desionizada. Na preparação da solução II dissolveram-se 13,6 g de acetato de sódio tri-hidratado em 1 L de água desionizada. O pH das soluções tampão preparadas foi testado com medidor de pH e ajustado para o pH pretendido com pequenos incrementos de volume das soluções I ou II.

Tabela 2.1. – Quantidades a adicionar de cada solução para preparação de 1 L de solução tampão acetato para o pH pretendido (Snyder *et al.*, 1997).

| pH | Solução I (mL) | Solução II (mL) |
|-----|----------------|-----------------|
| 5,0 | 296 | 704 |
| 4,0 | 820 | 180 |
| 3,5 | 926 | 74 |

iii) Preparação de eluentes para cromatografia líquida

Na preparação dos eluentes para HPLC, usou-se a solução tampão de acetato pH 4,0 e acetonitrilo adicionados na proporção de 73:27 (v/v) para o eluente A e 65:35 (v/v) para o eluente B. Os eluentes foram filtrados com membrana de nylon 0,2 µm num sistema de filtração de eluentes. Todos os eluentes foram desgaseificados em banho de ultra-sons durante, pelo menos, 15 minutos.

iv) Preparação de soluções para extracção e derivatização das sulfonamidas

Para a extracção das sulfonamidas no mel utilizou-se a solução tampão de acetato pH 5,0, cujo procedimento de preparação se encontra descrito no ponto preparação de soluções tampão (ii).

A solução de fluorescamina para derivatização das amostras de mel e padrões de sulfonamidas foi preparada numa concentração de 0,2% (% m/v) usando a acetona como solvente.

2.2.4. Condições cromatográficas para análise de sulfonamidas

Foram testadas diversas condições cromatográficas para separação das sulfonamidas baseadas na literatura consultada (Pang *et al.*, 2003; Pereira, 2003; Posyniak *et al.*, 2003; Maudens *et al.*, 2004), com o objectivo de estabelecer o melhor método de análise de sulfonamidas em mel por HPLC-FL.

A melhor resolução e separação cromatográfica das sulfonamidas foi obtida, após terem sido experimentados diferentes gradientes e eluentes. Os eluentes seleccionados foram:

- eluente A - solução tampão acetato (pH 4,0) e acetonitrilo (73:27, v/v);
- eluente B - solução tampão acetato (pH 4,0) e acetonitrilo (65:35, v/v).

O gradiente do eluente otimizado foi: 100% A durante 5 minutos, de 100% a 0% de A em 2 minutos, 0% A durante 23 minutos, de 0% a 100% de A em 2 minutos e 100% de A durante 8 minutos. O fluxo escolhido foi de 0,5 mL/min e a temperatura da coluna no forno de 32 °C. O volume injectado foi de 20 µL e a temperatura do injectador foi fixada em 4 °C. A detecção foi efectuada com os comprimentos de onda de emissão e de excitação de 495 e 405 nm, respectivamente. O ganho do detector de fluorescência foi fixado em 100 e a atenuação em 8.

2.2.5. Identificação das sulfonamidas

As sulfonamidas foram identificadas com base na comparação dos tempos de retenção dos respectivos padrões comerciais, injectados separadamente, com os tempos de retenção quando as sulfonamidas se encontram em mistura.

2.2.6. Procedimento de extracção de sulfonamidas em mel

Testaram-se dois processos de extracção para dosear sulfonamidas no mel; o primeiro teve como base, o procedimento definido para o teste CHARM II e o segundo processo de extracção testado foi o referido por Posyniak *et al.* (2003).

Dos dois procedimentos de extracção testados, no que se verificou melhores resultados, foi o descrito por Posyniak *et al.* (2003), com as seguintes modificações: pesou-se $1 \pm 0,1$ g de mel, adicionaram-se 10 mL de solução tampão acetato (0,1 M; pH 5,0), adicionou-se o padrão interno sulfameter (20 µg/kg de mel), agitou-se até dissolução do mel e colocou-se em banho de ultra-sons durante 15 minutos. De seguida, a solução foi filtrada com filtro de fibra de vidro. A solução foi extraída em coluna SPE-C18, previamente condicionada com 5 mL de metanol, 5 mL de água desionizada e 5 mL de solução tampão acetato (0,1 M; pH 5,0). A lavagem da coluna foi efectuada com 3 mL de solução tampão acetato (0,1 M; pH 5,0) e 5 mL de água desionizada. Após lavagem, a coluna foi seca sob vácuo durante 5 minutos. A eluição das sulfonamidas foi efectuada com 2,4 mL de acetonitrilo.

2.2.7. Procedimento de derivatização de padrões e amostras

Para derivatização de soluções padrão de sulfonamidas, a 0,5 mL de solução padrão foram adicionados 0,5 mL de solução tampão acetato (0,1 M; pH 3,5) e, após agitação em vortex, adicionou-se 0,2 mL de solução de fluorescamina a 0,2%, voltando-se a agitar em vortex. A mistura foi colocada a incubar durante 20 minutos a 30 °C.

Nas amostras de mel, a derivatização foi efectuada após extracção das sulfonamidas do mel. Aos 2,4 mL de eluato da extracção de sulfonamidas em SPE-C18, adicionaram-se 2,4 mL de solução tampão acetato (0,1 M; pH 3,5), agitou-se em vortex, adicionaram-se 0,2 mL de solução de fluorescamina 0,2%, e voltou-se a agitar em vortex. De seguida efectuou-se a incubação durante 20 minutos a 30 °C.

Após a incubação, todas as soluções padrão de sulfonamidas e extractos de sulfonamidas de amostras de mel derivatizados foram filtradas com filtro de nylon 0,2 µm e injectadas no HPLC. Todas as soluções derivatizadas foram guardadas no escuro a 4 °C.

2.3. PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC

Qualquer método experimental de análise necessita de verificar critérios de qualidade para se poder ter confiança nos resultados analíticos. Este processo corresponde à validação do método que passa pela avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho do método de análise de sulfonamidas por HPLC: método de calibração, linearidade e sensibilidade, limites de detecção e de quantificação, selectividade, precisão e exactidão.

Devido à matriz do mel ser bastante complexa e variada, houve a necessidade de classificar o mel em cores segundo uma escala de cor PFund (procedimento de determinação da cor descrito no anexo A). Assim, dividiu-se o mel em mel “claro” e mel “escuro”, uma vez que se verificaram diferenças significativas nos cromatogramas obtidos ao nível da linha de base e ao nível dos índices de recuperação de sulfonamidas. Foram preparadas duas misturas de méis (descontaminação confirmada por CHARM e HPLC), com base na escala de cor PFund: uma contendo méis classificados como “claros”, entre branco água e âmbar (mistura do mel “claro”); outra contendo méis classificados como “escuros” (mistura de mel “escuro”). Para efectuar as misturas, pesaram-se 5 gramas de cada mel, num total de 26 méis para a mistura de mel “claro” e

33 méis para a mistura de mel “escuro”. Os méis misturados foram méis analisados por CHARM II, com resultado negativo para a pesquisa de sulfonamidas. Toda a validação foi efectuada usando soluções de mistura de padrões de sulfonamidas com base de matriz de mistura de mel “claro” e de mel “escuro”, ou com amostras de mel contaminadas ou não, ou com soluções de mistura de padrões de sulfonamidas. Estas soluções sofreram o processo de extracção e de derivatização como descrito nos subcapítulos 2.2.6. e 2.2.7.

2.3.1. Método de calibração

A calibração do sistema cromatográfico foi efectuada através do método de sobreposição de matriz, que consistiu na adição das substâncias padrão de diversas concentrações a uma matriz de mel obtida por mistura de amostras de mel “escuro” ou de mel “claro”. Este método permitiu compensar o efeito da matriz embora tenha exigido um estudo duplicado do processo de validação (para méis “claros” e méis “escuros”).

A quantificação das sulfonamidas foi obtida pelo método do padrão interno, que consistiu na adição a todas as soluções de uma sulfonamida (sulfameter) de concentração conhecida (20 µg/kg de mel). As curvas de calibração foram obtidas tendo em conta a razão das áreas (área do pico de cada sulfonamida/área do pico do padrão interno com concentração constante) e a concentração de cada padrão sulfonamida existente na solução injectada. O sulfameter foi escolhido como padrão interno tendo por base a sua separação, boa resolução, o seu tempo de retenção e aparecer muito raramente nas amostras de mel de Portugal. A concentração escolhida (20 µg/kg de mel) foi baseada no tamanho de pico.

2.3.2. Linearidade e sensibilidade

A linearidade tem a ver com a capacidade do método em proporcionar resultados directamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de um dado intervalo de concentrações. A relação matemática entre o sinal e a concentração da substância em análise, pode ser exprimida através de uma equação de recta, denominada de curva analítica ou curva de calibração.

Foram adicionadas soluções padrão de sulfonamidas no intervalo de concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel à matriz de mel (mel “claro” e mel “escuro”). Na generalidade, a quantificação de sulfonamidas nas amostras de mel foi efectuada usando a recta de calibração com os padrões de concentração a variar entre 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cada solução foi analisada em triplicado.

A linearidade do método foi verificada através das curvas de calibração, determinadas para cada sulfonamida e obtidas por regressão linear da razão das áreas (área do pico de cada sulfonamida/área do pico de padrão interno) *vs* concentração de cada sulfonamida. A sensibilidade do método analítico para cada sulfonamida analisada é definida pelo respectivo declive obtido da regressão linear referida anteriormente.

2.3.3. Limites de detecção e de quantificação

A menor concentração de uma substância que pode ser detectada, utilizando um dado procedimento experimental, é representada pelo limite de detecção (LD). A menor concentração de uma substância que pode ser quantificada, utilizando um procedimento experimental, denomina-se de limite de quantificação (LQ).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através de parâmetros da curva analítica: erro padrão da ordenada da origem da recta de calibração (s) e declive da respectiva recta (m). Os LD e LQ foram determinados usando as equações 1 e 2, referidas no capítulo 1.4. “Validação de métodos analíticos”.

2.3.4. Selectividade

A selectividade avalia a capacidade de identificar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de compostos que podem interferir com a sua determinação.

A selectividade foi avaliada por comparação dos cromatogramas obtidos de amostras de mel “claro” e “escuro” não contaminadas com sulfonamidas (amostras negativas no teste de CHARM), com os cromatogramas obtidos de amostras de mel em que se adicionou mistura de padrões de sulfonamidas. Todas as amostras de mel foram submetidas ao processo de derivatização e de extracção em SPE-C18. Foram injectadas 6 amostras de méis classificados como méis “claros” e 6 amostras de méis classificados como “escuros”.

2.3.5. Precisão

A precisão caracteriza a dispersão de resultados entre ensaios sob condições definidas e foi avaliada tendo em conta a repetibilidade e precisão intermédia.

O estudo da repetibilidade do método consistiu na análise, no mesmo dia, de duas soluções preparadas com matriz de mistura de mel (matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro”), em que foram adicionadas soluções de mistura de padrões de sulfonamidas com as concentrações de 10 e 25 µg/kg de mel. Estas soluções sofreram o processo de extracção e de derivatização. Cada solução foi analisada sete vezes consecutivas. Foi efectuado o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação das áreas dos picos de cada sulfonamida para avaliar a precisão.

A precisão intermédia do método foi estudada com duas soluções de mistura de padrões de sulfonamidas preparadas com matriz de mistura de mel (quer para mel “claro”, quer para mel “escuro”), com as concentrações de 10 e 25 µg/kg de mel. Estas soluções sofreram o processo de extracção e de derivatização. Cada solução foi analisada em seis dias diferentes. A precisão, foi avaliada pelo cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação das áreas dos picos de cada sulfonamida obtidas por injeções dessas amostras.

Para testar a repetibilidade e precisão intermédia em amostras de mel efectuou-se a extracção das sulfonamidas, em triplicado, de uma amostra de mel considerada de cor “claro” e de uma amostra de considerado “escuro”, que se encontrava contaminada com sulfatiazol. Cada extracto foi analisado em triplicado e em dois dias diferentes. Foi também efectuado o cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação das quantificações obtidas para avaliar a precisão da extracção.

2.3.6. Exactidão

A exactidão refere-se ao grau de concordância entre resultados individuais num dado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro.

A exactidão foi avaliada através de ensaios de recuperação em amostras de mel. Nos ensaios de recuperação usaram-se soluções mistura de padrões de sulfonamidas em matriz de amostras de mel (quer para mel “claro”, quer para mel “escuro”) com concentrações de 10 e 25 µg/kg de mel. As soluções foram extraídas e derivatizadas segundo o procedimento anteriormente referido nos sub-capítulos 2.2.6. e 2.2.7. Cada

solução foi injectada em seis dias diferentes. A percentagem de recuperação foi determinada relacionando-se a quantidade medida com a quantidade adicionada.

Foi ainda avaliada a exactidão quando se trata apenas de um composto presente na amostra, por ensaios de recuperação apenas para sulfatiazol, foram adicionados 10 µg de sulfatiazol/kg de mel, a uma matriz de mel “claro” e a uma matriz de mel “escuro”, foram efectuadas 3 extracções de cada amostra e analisadas por HPLC também em triplicado. A percentagem de recuperação foi determinada relacionando-se a quantidade medida com a quantidade adicionada.

Utilizou-se também o método da adição padrão, que consistiu na adição de solução padrão de sulfatiazol, numa concentração de 25 µg/kg de mel, a uma amostra de mel que já se encontrava contaminada com sulfatiazol (concentração de sulfatiazol determinada por HPLC). Foram efectuadas 5 extracções da amostra de mel com adição de padrão e, posteriormente analisada por HPLC. Para avaliar a exactidão do método, para todos os ensaios relacionou-se a quantidade medida com a quantidade adicionada, pela aplicação da equação 4, referida no capítulo 1.4. “Validação de métodos analíticos”.

2.4. ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL POR CHARM II E HPLC

A seguir descrevem-se os procedimentos para análise de sulfonamidas em amostras de mel por CHARM II e por HPLC-Fluorescência.

2.4.1. Análise de sulfonamidas por CHARM II

Os reagentes, equipamentos e os procedimentos usados na preparação de soluções e análise de sulfonamidas no mel por CHARM II encontram-se descritos a seguir.

2.4.1.1. Reagentes

A maioria dos reagentes utilizados na análise de sulfonamidas em mel foram fornecidos pela CHARM Sciences Inc.: “MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard” (mistura de vários antibióticos, entre os quais a sulfonamida sulfametazina), fornecido em pó; “Zero Control Standard” (leite em pó, comparável a leite de vaca certificado sem antibiótico); “CHARM II Test for Sulfa Drug in Honey” (tablete de reagente de análise, constituído por uma “pastilha” branca – anticorpo receptor e outra

“pastilha” rosa – partícula localizadora marcada com ^3H); “Opti-fluor” (reagente de cintilação).

Para hidrólise das amostras usou-se ácido clorídrico a 37% da Fisher Scientific e para acerto do pH usou-se hidróxido de sódio, qualidade PA da Pronalab.

O metanol utilizado na extracção das amostras de mel, de qualidade HPLC, foi adquirido à Lab-Scan.

A água desionizada foi obtida através de um sistema de desionização TGI Pure Water Systems.

2.4.1.2. Equipamento

A pesagem das amostras de mel e padrões de sulfonamidas foi efectuada numa balança analítica de marca AE modelo AAA 160L, com precisão de 0,1 mg.

Para testar o pH das amostras de mel usou-se um medidor de pH de marca Hanna Instruments, modelo pH 211 Microprocessor pH Meter.

Na extracção das amostras de mel por SPE (extracção em fase sólida) foi utilizado um sistema Manifold marca Macherey-Nagel, modelo Chromabond, com capacidade de extracção de 24 amostras em simultâneo e uma bomba de vácuo Charles Austen Pumps modelo DA7C.

O equipamento necessário à análise de sulfonamidas, após a extracção, foi adquirido à CHARM Sciences Inc.: Vortex maxi mix II (Thermolyne), Incubadora dupla (Charm Inctronic 2TM), Centrifuga Labofuge 200 (Heraeus) e analisador CHARM II 6600 (Charm Sciences Inc.).

2.4.1.3. Preparação de soluções

O “MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard” e o “Zero Control Standard” foram reconstituídos com 10 e 100 mL de água desionizada, respectivamente.

Apenas foram preparadas no laboratório as soluções para hidrólise e acerto do pH das amostras de mel. Para hidrólise das amostras de mel utilizou-se ácido clorídrico 1 M, preparado diluindo 83 mL de ácido clorídrico concentrado em 1 L de água desionizada. Para acerto do pH utilizaram-se soluções de hidróxido de sódio a 30 e 0,3%. A solução a 30% foi preparada dissolvendo 30 gramas de hidróxido de sódio em

100 mL de água desionizada. A solução de hidróxido de sódio a 0,3% foi preparada a partir da solução a 30%, por diluição.

2.4.1.4. Procedimento experimental

O método utilizado para detecção de sulfonamidas em mel foi desenvolvido pela empresa CHARM Sciences Inc. O procedimento experimental encontra-se detalhadamente descrito no anexo B.

O procedimento de análise de sulfonamidas em mel envolve um passo de hidrólise ácida da amostra para quebra das ligações glicosídicas, seguido de um processo de acerto de pH e extracção em coluna SPE-C18. Após o processo de extracção e secagem do eluato, foram adicionados os reagentes de forma sequencial como descrito no procedimento experimental e de seguida as amostras foram analisadas no analisador CHARM II 6600.

2.4.2. Análise de sulfonamidas por HPLC-Fluorescência

Tal como para as amostras de mel utilizadas na validação do método de análise de sulfonamidas em mel por HPLC, cada amostra de mel foi classificada segundo a escala de cor PFund, utilizando o procedimento descrito no anexo A. A quantificação das sulfonamidas em amostras de mel foi efectuada utilizando a equação da curva de calibração de cada sulfonamida identificada, tendo em conta a sua cor (mel “claro” ou mel “escuro”).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 3.1. OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC
- 3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC
- 3.3. ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL

Neste trabalho experimental, pretendeu-se otimizar e validar um método de análise de sulfonamidas por HPLC-Fluorescência, com o objectivo de quantificar e identificar as sulfonamidas nas amostras de mel que deram resultados positivos usando o método qualitativo CHARM II.

Começa-se por fazer uma breve descrição sobre os testes efectuados na optimização das condições cromatográficas para análise de sulfonamidas, do processo de extracção de sulfonamidas no mel e da derivatização de padrões e amostras. A seguir, apresentam-se os parâmetros analíticos avaliados no processo de validação do método, bem como, a respectiva análise de dados. Posteriormente, apresentam-se e analisam-se os resultados das análises às amostras de mel efectuadas pelo teste CHARM II e pelo método validado de HPLC-FL.

3.1. OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC

No processo de optimização do método de análise de sulfonamidas em mel por HPLC procedeu-se ao estudo das condições cromatográficas para análise de 11 sulfonamidas, seguindo-se o estudo das condições de extracção e de derivatização das sulfonamidas no mel. As sulfonamidas identificadas por CHARM II e que foram consideradas de interesse analisar por HPLC-FL foram: sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxipiridazina, sulfameter (padrão interno), sulfisoxazol, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadoxina e sulfaquinoxalina.

3.1.1. Optimização das condições cromatográficas

Na optimização das condições cromatográficas para a separação das sulfonamidas, efectuou-se a escolha do sistema de eluentes mais adequado, gradiente de eluentes, temperatura da coluna e fluxo do eluente.

Na selecção do melhor sistema de eluentes, com o objectivo de separar e analisar 11 sulfonamidas, testaram-se 4 fases móveis com as composições e condições a seguir referidas:

- Fase móvel: ácido acético a 2% (eluente A) e acetonitrilo (eluente B); modo gradiente usando 70% de A durante 2 minutos, variação de 70% a 80% de A em 3 minutos, variação de 80% a 60% de A em 7 minutos, variação de 60% a 70% de A em 7 minutos; Fluxo de 0,9 mL/min; Temperatura do forno a 55 °C

(Posyniak *et al.*, 2003).

- Fase móvel: acetonitrilo e 0,01 mol/L de di-hidrogeno fosfato de potássio (pH ajustado a 3,5-4,0) na proporção de 27:73 (em modo isocrático); Fluxo de 1,0 mL/min; Temperatura do forno à temperatura ambiente (Pang *et al.*, 2003).
- Fase móvel: solução tampão acetato 0,02M (ajustado a pH 4,75) e acetonitrilo na proporção de 98:2 (eluyente A), solução tampão acetato 0,02M (ajustado a pH 4,75) e acetonitrilo na proporção de 68:32 (eluyente B); modo gradiente usando uma variação de 2% a 35% de B em 31 minutos, variação de 35% a 75% de B em 10 minutos, lavagem da coluna com 95% de B e as condições iniciais foram restabelecidas; Fluxos testados de 0,7 mL/min e 1,0 mL/min; Temperatura do forno a 45 °C e 35 °C (Maudens *et al.*, 2004).
- Fase móvel: solução tampão acetato (0,1M; pH 5,0) e acetonitrilo na proporção de 70:30 e 80:20 (em modo isocrático); Fluxo testado entre 0,5 - 1,0 mL/min; Temperatura do forno a 55 °C e 35 °C (Pereira, 2003).

Das 4 fases móveis testadas, a que permitiu melhor separação de um maior número de sulfonamidas e em menor tempo de corrida foi o quarto sistema nas condições seguintes: solução tampão acetato (0,1M; pH 5,0) e acetonitrilo, à temperatura de 35 °C e fluxo 1,0 mL/min Após selecção deste eluyente, testou-se a influência do pH do eluyente (4,0; 4,5; 4,75; 4,9; 5,0; 5,1) nos tempos de retenção e separação das 11 sulfonamidas. Verificou-se que a influência do valor de pH foi significativa nos tempos de retenção das sulfonamidas, tendo-se seleccionado o eluyente de pH 4,0, visto que, a este valor, a separação de 11 sulfonamidas apresentava um binómio separação/tempo de retenção mais favorável. Este eluyente foi testado em modo isocrático (numa proporção de 70:30 ou 80:20 de solução tampão acetato: acetonitrilo) e em modo de gradiente. Diversos gradientes de eluyente foram testados, variando-se a composição dos eluyentes (proporção entre solução tampão acetato e acetonitrilo) bem como a programação do gradiente no tempo. O melhor resultado, ao nível da separação das 11 sulfonamidas foi obtido em modo de gradiente nas seguintes condições: solução tampão acetato (0,1M; pH 4,0) e acetonitrilo (na proporção de 73:27, v/v) (eluyente A), solução tampão acetato (0,1M; pH 4,0) e acetonitrilo (na proporção de 65:35, v/v) (eluyente B); 100% A durante 5 minutos, variação de 100% a 0% de A em 2 minutos, 0% A durante 23 minutos, variação de 0% a 100% de A em 2 minutos e 100% de A durante 8 minutos.

Foi avaliada a influência da temperatura da coluna (55 °C, 35 °C e 32 °C) na separação das sulfonamidas, tendo-se verificado uma melhor separação entre os picos das sulfonamidas à temperatura de 32 °C.

Para melhorar a separação cromatográfica, testaram-se 5 fluxos (1,0; 0,8; 0,7; 0,6 e 0,5 mL/min) tendo-se verificado que os cromatogramas com melhor separação dos picos das sulfonamidas eram obtidos com o fluxo de 0,5 mL/min

Por fim, optimizou-se a temperatura do amostrador automático, pois verificou-se que para a injeção de uma solução padrão de sulfonamidas derivatizadas à temperatura ambiente ocorria diminuição nas áreas dos picos ao longo do tempo (atribuído à degradação do composto fluorescente). A temperatura do amostrador automático foi fixada em 4 °C de forma a evitar a degradação das sulfonamidas derivatizadas em solução. O volume injectado foi de 20 µL. A detecção foi efectuada com os comprimentos de onda de emissão e de excitação de 495 e 405 nm, respectivamente, referidos por Pang *et al.* (2003) e Posyniak *et al.* (2003).

Após a selecção das condições cromatográficas que permitiram um melhor desempenho na separação das 11 sulfonamidas, efectuou-se o estudo de identificação dos picos cromatográficos das sulfonamidas, através dos tempos de retenção.

3.1.2. Identificação das sulfonamidas

Para o estudo dos tempos de retenção de cada sulfonamida foram injectadas soluções de padrões individuais das 11 sulfonamidas obtidas de compostos adquiridos comercialmente. Na Tabela 3.1. são apresentados os tempos de retenção obtidos de cada sulfonamida nas soluções mistura de padrões de sulfonamidas. O cromatograma típico obtido para uma solução de mistura de padrões de sulfonamidas encontra-se apresentado na Figura 3.1. As sulfonamidas apresentam tempos de retenção entre 18 e 36 minutos. No intervalo de tempos de retenção de 0 a 18 minutos, o cromatograma apresenta picos de solvente e de outras substâncias que não estão identificadas.

Tabela 3.1. – Tempos de retenção (TR) obtidos para cada sulfonamida da análise cromatográfica de uma mistura de padrões de sulfonamidas.

| Sulfonamida | Tempo de retenção (TR) (min)* |
|-----------------------|-------------------------------|
| Sulfatiazol | 18,15 |
| Sulfamerazina | 18,58 |
| Sulfametazina | 19,29 |
| Sulfametizol | 20,40 |
| Sulfametoxipiridazina | 20,92 |
| Sulfameter (p.i.) | 22,76 |
| Sulfisoxazol | 25,07 |
| Sulfadoxina | 27,37 |
| Sulfametoxazol | 28,14 |
| Sulfadimetoxina | 33,62 |
| Sulfaquinoxalina | 34,87 |

* Valor médio de 10 injeções consecutivas.

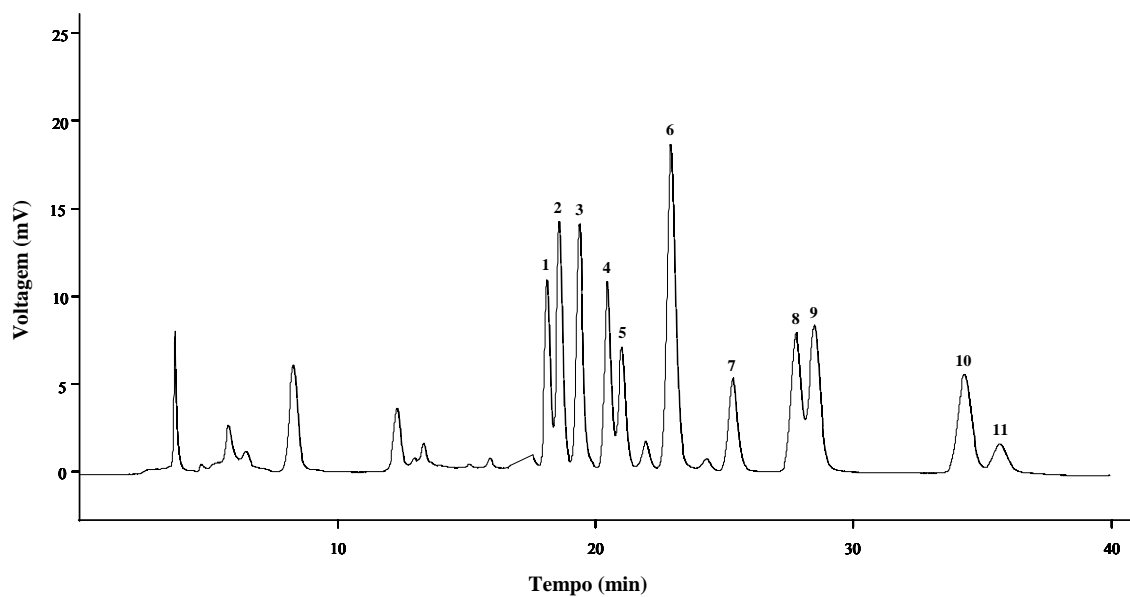


Figura 3.1. – Cromatograma de uma mistura de padrões: 1- sulfatiazol, 2- sulfamerazina, 3- sulfametazina, 4- sulfametizol, 5- sulfametoxipiridazina, 6- sulfameter (p.i.), 7- sulfisoxazol, 8- sulfadoxina, 9- sulfametoxazol, 10- sulfadimetoxina, 11- sulfaquinoxalina.

A estabilidade do sistema cromatográfico foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV%). Os tempos de retenção (TR) de cada sulfonamida obtidos da análise de uma mistura de padrões tiveram valores de coeficientes de variação, em geral, inferiores a 1% para 10 injeções consecutivas e inferiores a 3% para 10 injeções diárias, em 5 dias diferentes. Estes valores de CV% indicam uma boa estabilidade do sistema cromatográfico.

De forma global, mostrou-se ser possível analisar em simultâneo as 11 sulfonamidas embora se verifique sobreposição de 2 picos em alguns dos casos, mas, com resolução suficiente para se efectuarem análises quantitativas uma vez que se efectua tratamento do sinal.

Após optimização das condições cromatográficas e identificação dos picos das sulfonamidas no cromatograma com soluções padrão, procedeu-se à optimização da extracção das sulfonamidas em mel.

3.1.3. Optimização da extracção de sulfonamidas em mel

O mel é uma matriz bastante complexa, sendo necessário efectuar a extracção das sulfonamidas do mel antes da análise por HPLC. As sulfonamidas no mel encontram-se ligadas a açúcares e, por isso, efectuou-se uma hidrólise das sulfonamidas no mel que, posteriormente, foram extraídas com SPE-C18.

Testaram-se dois processos de extracção de sulfonamidas no mel; o primeiro processo teve como referência o procedimento de análise de sulfonamidas por CHARM II (anexo B) e o segundo procedimento baseou-se no trabalho referido por Posyniak *et al.* (2003).

Os testes foram efectuados com amostras de mel contaminado com sulfonamidas e com amostras de mel descontaminadas em sulfonamidas (analisadas por CHARM) e foram posteriormente contaminadas por adição de padrão.

No método de extracção baseado no teste CHARM II testaram-se variações do valor de pH de extracção (7,0; 7,5 e 8,0) e após a extracção da amostra, avaliou-se a necessidade do processo de secagem do eluato da extracção. No processo de secagem testou-se o uso de uma incubadora (a 35 °C) e o uso de um caudal de azoto.

Estas variações foram avaliadas com o intuito de aumentar a eficiência da extracção das sulfonamidas em mel e diminuir as interferências presentes no extracto da amostra. Ao nível dos resultados, verificou-se não existir melhorias significativas na eficiência

da extracção (através da visualização do cromatograma) com a mudança de pH. Para a secagem do eluato também não se verificaram melhorias na eficiência da extracção. Em geral, os resultados obtidos com a referida extracção não foram satisfatórios, porque os cromatogramas mostraram que o extracto da amostra apresentava bastantes interferências e uma eficiência de extracção reduzida.

No segundo método e com os mesmos objectivos referidos no método anterior (seleccionar o procedimento que permite ter um cromatograma com menos interferências e um extracto de sulfonamidas em mel com maior percentagem de recuperação), testou-se:

- quantidade de mel (1 g; 2,5 g e 5g);
- volume de solução tampão acetato para diluição da amostra (10 mL, 12,5 mL e 25 mL);
- tempo de hidrólise em banho de ultra-sons: (15, 30, 60, 90 e 120 minutos);
- filtração da amostra com filtro de fibra de vidro (1 filtração e 2 filtrações consecutivas);
- eluição da amostra com acetonitrilo (2 mL, 2,4 mL, 3 mL e 5 mL), com solução tampão acetato pH 3,5 (4,8 mL) e com acetonitrilo + solução tampão acetato pH 3,5 (na proporção 1:1) (4,8 mL);
- secagem do eluato (na hotte, na placa de aquecimento e com caudal de azoto; secagem total e parcial).

Este estudo foi efectuado numa amostra de mel contaminada com mistura de padrões de sulfonamidas e com amostras de mel contaminadas (amostras de mel com resultado positivo em contaminação de sulfonamidas usando o teste CHARM II).

Nos testes de extracção de sulfonamidas com várias massas de mel, verificou-se que quanto menor a massa de mel usada na extracção das sulfonamidas, menores as interferências de picos desconhecidos no cromatograma, resultando uma linha de base mais limpa e com menos ruído.

A solução tampão acetato foi usada para dissolver a amostra de mel e para efectuar a hidrólise das sulfonamidas no mel. A variação do volume de solução tampão acetato na extracção de sulfonamidas em mel não apresentou qualquer melhoria na eficiência da extracção de sulfonamidas.

Já o tempo de hidrólise em banho de ultra-sons mostrou ser um passo importante na extracção de sulfonamidas em mel. Verificou-se que após 60 minutos de hidrólise, em banho de ultra-sons, ocorria a degradação de alguns picos de sulfonamidas extraídas do mel (picos de intensidade inferiores ao esperado) e que também não havia melhoria na eficiência da extracção com 30 minutos de hidrólise quando comparado com os resultados obtidos com hidrólise de 15 minutos.

Como já foi referido, as interferências da matriz do mel foram o maior problema na análise de sulfonamidas em mel. Foram testadas uma e duas filtrações do mel hidrolisado com filtro de fibra de vidro, antes da extracção em coluna SPE (com o objectivo de remover partículas existentes no mel, como por exemplo, ceras). A primeira filtração mostrou ser necessária para a remoção de partículas existentes na amostra de mel mas, não se verificaram diferenças significativas no perfil cromatográfico das sulfonamidas extraídas de amostras de mel com o uso de uma segunda filtração.

No processo de eluição das sulfonamidas retidas na coluna SPE-C18 foram avaliados os efeitos do volume de eluição e solvente de eluição. Foi testada a eluição das sulfonamidas do mel retidas na coluna SPE-C18 com acetonitrilo (2,0 mL; 2,4 mL; 3,0 mL e 5 mL), com solução tampão acetato (0,1M; pH 3,5) (4,8 mL) e acetonitrilo + solução tampão acetato na proporção de 1:1 (4,8 mL). Os melhores resultados ao nível de quantidade de sulfonamidas eluídas da coluna SPE-C18 foram obtidos com o acetonitrilo como solvente de eluição, apesar das interferências no cromatograma serem maiores. Quanto ao volume de eluição, verificou-se que a maioria das sulfonamidas foram eluídas nos primeiros 2 mL, tendo-se estabelecido o volume de 2,4 mL como volume de eluição para garantir a eluição total das sulfonamidas no mel das colunas SPE-C18.

Por fim, testou-se a necessidade de utilizar um passo de secagem do extracto da amostra de mel após eluição da coluna SPE-C18, para efectuar pré-concentração das sulfonamidas extraídas do mel. Testou-se a secagem total ou parcial do eluato na hotte (por circulação do ar), em placa de aquecimento e com caudal de azoto. Por uma questão de rapidez e facilidade a secagem em azoto apresentou-se a mais promissora, no entanto verificou-se uma grande dificuldade na dissolução do resíduo seco. Quando se utilizou a solução de derivatização para dissolver o resíduo, a eficiência da extracção foi muito reduzida, só se conseguindo obter uma eficiência aceitável quando se utilizou acetonitrilo para dissolver o resíduo. Verificou-se também que, em geral, com o

processo de secagem do eluato os cromatogramas respectivos mostravam mais interferências, dificultando a quantificação das sulfonamidas. Optou-se por não efectuar a secagem do eluato sendo a derivatização efectuada directamente no extracto de amostra de mel após eluição da coluna SPE-C18.

3.1.4. Optimização da derivatização de padrões e amostras com fluorescamina

A derivatização é um passo necessário para a análise de sulfonamidas por HPLC com detector de fluorescência, uma vez que estes compostos não apresentam fluorescência própria. Neste trabalho o reagente de derivatização escolhido foi a fluorescamina, sendo o reagente de derivatização referido na literatura por Pang *et al.* (2003) e Posyniak *et al.* (2003), quando efectuada a derivatização pré-coluna.

Todas as soluções padrão e amostras sofreram um processo de derivatização antes da injeção em HPLC. A optimização do processo de derivatização foi efectuada em soluções de mistura de padrões de sulfonamidas e, depois, foi também aplicada em amostras de mel.

O procedimento usado para a derivatização foi baseado nos trabalhos referidos por Pang *et al.* (2003) e Posyniak *et al.* (2003). No trabalho de optimização das condições de derivatização testou-se o efeito dos seguintes factores: volume de solução de fluorescamina, tempo e temperatura de derivatização.

A solução de fluorescamina, de concentração 0,2% (% m/v), foi adicionada usando os volumes de 0,1 e 0,2 mL à solução padrão em tampão acetato, com o objectivo de verificar se haveria influência na intensidade dos picos das sulfonamidas no cromatograma. Os resultados de HPLC mostraram que o melhor sinal é obtido quando se usa 0,2 mL de solução de fluorescamina para derivatização.

Em relação ao tempo de reacção e à temperatura de derivatização testaram-se tempos de 20 e 30 minutos de reacção, às temperaturas ambiente e 30 °C. Verificou-se que o binómio tempo/temperatura que apresentava melhor eficiência de derivatização foi de 20 minutos a 30 °C.

Para evitar a degradação da fluorescência dos compostos derivatizados, as soluções derivatizadas foram mantidas no escuro a 4 °C até se proceder à sua análise.

3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM MEL POR HPLC

Como foi referido anteriormente, qualquer método analítico, após a optimização do procedimento analítico, necessita de mostrar a sua fiabilidade através da avaliação de parâmetros de desempenho, que globalmente se define como validação.

De forma global, os testes foram efectuados usando soluções padrão de calibração de mistura de 11 sulfonamidas, soluções de controlo de qualidade preparadas com matriz de méis descontaminados em sulfonamidas e com amostras de mel. Todas as soluções preparadas com matriz de mel sofreram a derivatização com fluorescamina após a extracção de sulfonamidas com SPE-C18.

O estudo efectuado foi duplicado uma vez que se verificou que a matriz de mel “claro” e de mel “escuro” afectava a quantificação de algumas sulfonamidas, assim prepararam-se soluções padrão de calibração e de controlo de qualidade tendo como base quer a matriz de mel “claro” e quer, a matriz de mel “escuro”.

Os parâmetros analíticos avaliados na validação do método foram: o método de calibração, linearidade e sensibilidade, selectividade, precisão, exactidão e limites de detecção e de quantificação.

Os resultados obtidos para a validação do método cromatográfico optimizado são apresentados de seguida.

3.2.1. Método de calibração

A matriz do mel é bastante complexa e variada, afectando a quantificação das sulfonamidas nas amostras e, por isso, necessitou-se de utilizar um método que compensasse o efeito de matriz. A calibração do sistema cromatográfico foi efectuada pelo método de sobreposição de matriz, que consistiu na adição das sulfonamidas padrão, em diversas concentrações, às misturas de amostras de mel isentas de sulfonamidas (méis analisados pelo teste CHARM II). O mel foi dividido em mel “claro” e mel “escuro”, seguindo a escala de cor PFund. Preparou-se uma mistura de mel “claro” e outra de mel “escuro” usando vários méis de forma a garantir uma matriz similar às amostras a analisar, como descrito no capítulo 2.3. O estudo para a validação do método de análise de sulfonamidas em mel foi efectuado em duplicado, pois prepararam-se soluções padrão de calibração e controlo de qualidade com matriz de mel “claro” e outras soluções com matriz de mel “escuro”. Este método de calibração foi utilizado conjuntamente com o método de padrão interno, que consistiu na adição de

uma substância a todas as soluções a analisar, a sulfonamida sulfameter, de concentração conhecida (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel).

A sulfameter foi escolhida como padrão interno tendo por base a sua separação, a sua boa resolução, o seu tempo de retenção e também pelo facto de não aparecer nas amostras de mel de Portugal. A concentração escolhida (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel) foi baseada na resposta obtida no cromatograma para esta substância.

3.2.2. Linearidade e sensibilidade

A linearidade do método foi estudada no intervalo de concentrações de sulfonamidas de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel, tendo-se verificado uma relação linear entre as áreas dos picos referentes a cada sulfonamida e a sua concentração, quando as soluções padrão foram injectadas sem o efeito de matriz de mel e quando as soluções padrão foram preparadas tendo como base a matriz de mel “claro” ou de mel “escuro” (com matriz de mel as soluções sofreram extracção com SPE-C18). Na Figura 3.2. encontram-se representadas, a título de exemplo, as rectas de calibração obtidas para o sulfatiazol, com solução padrão sem efeito de matriz do mel e com as soluções padrão preparadas tendo como base as matrizes de mel (“claro” ou “escuro”). Por uma questão de fácil visualização e de comparação das rectas obtidas com soluções padrão com e sem efeito de matriz, as unidades da concentração apresentadas na figura são de $\mu\text{g}/\text{L}$. As curvas de calibração foram obtidas tendo em conta a razão das áreas (área do pico de sulfatiazol/área do pico de padrão interno, sulfameter, de concentração constante) de cada solução padrão de calibração e a razão das concentrações (concentração de sulfatiazol existente na solução injectada/concentração de padrão interno).

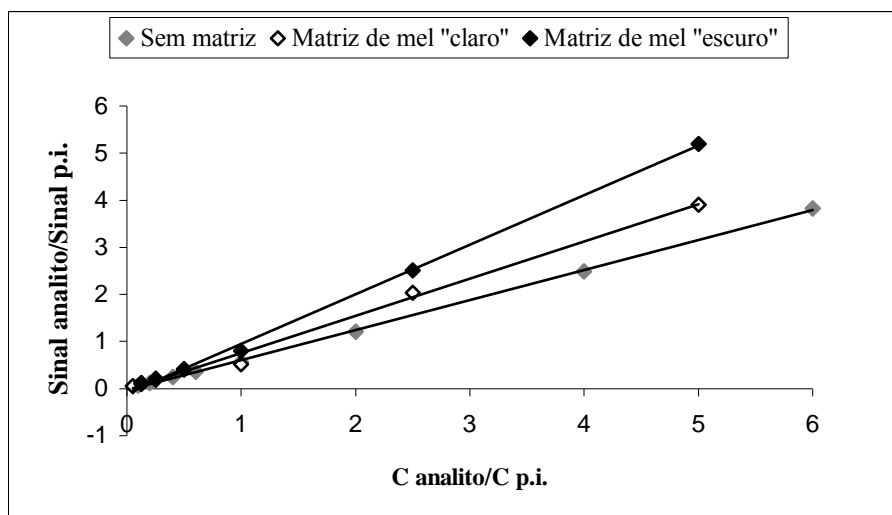


Figura 3.2. – Rectas de calibração para o sulfatiazol utilizando soluções padrão sem matriz e tendo como base a matriz do mel “claro” ou do mel “escuro”.

A figura mostra que as sensibilidades da medição do sulfatiazol são diferentes considerando o uso ou não de matriz de mel “claro” e “escuro”. Aliás, as medições com matriz de mel “escuro” são as que apresentavam maior sensibilidade (declive 1,05) na medição do sulfatiazol, seguida da matriz de mel “claro” (declive 0,79) e, com menor sensibilidade (declive 0,64), nas medições sem matriz de mel.

Estes resultados demonstram a necessidade da calibração ser efectuada tendo como base a matriz do mel, tendo-se obtido também resultados semelhantes para as restantes sulfonamidas. Assim, as calibrações usadas na quantificação das amostras de mel foram efectuadas tendo como base as matrizes do mel “claro” e do mel “escuro”.

As rectas de calibração foram obtidas por regressão linear simples e tendo em conta a razão das áreas (área do pico da sulfonamida/área do pico do sulfameter, padrão interno, com concentração constante) e a concentração da respectiva sulfonamida existente na solução injectada.

Para as substâncias sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfadoxina e sulfametoxazol verificou-se linearidade em toda a gama estudada (1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel). As sulfonamidas, sulfametizol e sulfisoxazol apresentaram linearidade a partir de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel, para as matrizes de mel “claro” e “escuro”. Para a sulfamerazina e sulfadimetoxina verificou-se existir linearidade a partir de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel e 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel, para matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro”, respectivamente. A sulfaquinoxalina apenas apresenta linearidade a partir de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel, para mel “claro” e mel “escuro”, respectivamente.

Na generalidade das amostras de mel foi utilizada a recta de calibração com as concentrações das soluções padrão de sulfonamidas a variar entre 1 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel, uma vez que não se esperavam níveis de contaminação de sulfonamidas superiores a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel nas amostras de mel a quantificar. Cada nível de concentração, ou seja, cada solução padrão de calibração foi injectada 3 vezes consecutivas. Para traçar as rectas foram utilizados os valores de cada repetição como um ponto.

Na Tabela 3.2. apresentam-se os parâmetros das rectas de calibração obtidos usando soluções padrão de calibração de mistura de sulfonamidas com matriz de mel “claro”, determinados pelo método de calibração de padrão interno, bem como, o número de soluções e intervalo de concentrações dos padrões de sulfonamidas usados na calibração.

Tabela 3.2. – Parâmetros das rectas de calibração obtidos para cada sulfonamida, em matriz de mel “claro” e determinados pelo método de calibração de padrão interno.

| Sulfonamida | Intervalos de concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel) | n* | Declive** (kg mel/ μg sulfonamida) | Ordenada na origem ** | r*** |
|-----------------------|--|----|---|---------------------------|--------|
| Sulfatiazol | 1 – 50 | 6 | 0,0432 ($\pm 0,0002$) | -0,001 ($\pm 0,005$) | 0,9998 |
| Sulfamerazina | 1 – 50 | 6 | 0,0571 ($\pm 0,0003$) | 0,000 ($\pm 0,007$) | 0,9998 |
| Sulfametazina | 1 – 50 | 6 | 0,0603 ($\pm 0,0008$) | -0,02 ($\pm 0,02$) | 0,9990 |
| Sulfametizol | 2,5 – 50 | 5 | 0,0390 ($\pm 0,0008$) | 0,04 ($\pm 0,02$) | 0,997 |
| Sulfametoxipiridazina | 1 – 50 | 6 | 0,0311 ($\pm 0,0005$) | 0,01 ($\pm 0,01$) | 0,998 |
| Sulfisoxazol | 2,5 – 50 | 5 | 0,0265 ($\pm 0,0002$) | 0,071 ($\pm 0,005$) | 0,9996 |
| Sulfadoxina | 1 – 50 | 6 | 0,0434 ($\pm 0,0003$) | 0,013 ($\pm 0,006$) | 0,9996 |
| Sulfametoxazol | 1 – 50 | 6 | 0,0453 ($\pm 0,0004$) | 0,026 ($\pm 0,009$) | 0,9994 |
| Sulfadimetoxina | 1 – 50 | 6 | 0,0409 ($\pm 0,0002$) | 0,010 ($\pm 0,004$) | 0,9998 |
| Sulfaquinoxalina | 5 - 100 | 5 | 0,0104 ($\pm 0,0002$) | 0,04 ($\pm 0,01$) | 0,997 |

* Número de soluções utilizadas para efectuar a recta.

** Valores médios \pm desvio padrão.

*** Coeficiente de correlação.

As sulfonamidas que apresentaram maior sensibilidade de análise foram a sulfametazina e a sulfamerazina, com declives superiores a 0,0571 kg de mel/ μg sulfonamida. A sulfonamida com sensibilidade mais baixa foi a sulfaquinoxalina, cuja recta de calibração apresentou um declive de 0,0104 kg de mel/ μg sulfonamida. As

restantes sulfonamidas apresentam declives entre 0,0265 e 0,0453 kg de mel/ μ g sulfonamida.

Os coeficientes de correlação obtidos são, em geral, bons ($r > 0,999$), excepto para as sulfonamidas sulfametizol, sulfametoxipiridazina e sulfaquinoxalina cujos coeficientes de correlação são aceitáveis ($0,995 < r < 0,999$).

Ao nível dos valores da ordenada na origem obtidas das calibrações de cada sulfonamida analisada, verificou-se que são valores próximos de zero, tal como esperado.

Globalmente, os parâmetros da regressão linear obtidos para as 10 sulfonamidas são aceitáveis ao nível dos coeficientes de correlação e das sensibilidades (com erros pequenos associados à repetição), bem como, das ordenadas na origem obtidas, uma vez que são valores próximos de zero.

Na Tabela 3.3. apresentam-se os parâmetros das rectas de calibração obtidos usando soluções padrão de calibração de mistura de sulfonamidas com matriz de mel “escuro”, determinados pelo método de calibração de padrão interno, bem como o número de soluções e intervalo de concentrações dos padrões de sulfonamidas usadas na calibração.

Tabela 3.3. – Parâmetros das rectas de calibração obtidos para cada sulfonamida, quando utilizada a matriz do mel “escuro”, determinada pelo método de calibração de padrão interno.

| Sulfonamida | Intervalo de concentração (μ g/kg de mel) | n* | Declive** (kg mel/ μ g sulfonamida) | Ordenada na origem** | r*** |
|-----------------------|--|----|---|-------------------------|--------|
| Sulfatiazol | 1 - 50 | 6 | 0,0546 ($\pm 0,002$) | -0,08 ($\pm 0,05$) | 0,994 |
| Sulfamerazina | 2,5 - 50 | 5 | 0,0659 ($\pm 0,0008$) | 0,05 ($\pm 0,02$) | 0,9994 |
| Sulfametazina | 1 - 50 | 6 | 0,070 ($\pm 0,001$) | -0,15 ($\pm 0,02$) | 0,9994 |
| Sulfametizol | 2,5 - 50 | 5 | 0,040 ($\pm 0,001$) | 0,01 ($\pm 0,03$) | 0,996 |
| Sulfametoxipiridazina | 1 - 50 | 6 | 0,048 ($\pm 0,001$) | 0,06 ($\pm 0,02$) | 0,998 |
| Sulfisoxazol | 2,5 - 50 | 5 | 0,0206 ($\pm 0,0006$) | 0,22 ($\pm 0,02$) | 0,995 |
| Sulfadoxina | 1 - 50 | 6 | 0,059 ($\pm 0,001$) | 0,22 ($\pm 0,04$) | 0,998 |
| Sulfametoxazol | 1 - 50 | 6 | 0,0634 ($\pm 0,0009$) | 0,01 ($\pm 0,02$) | 0,9990 |
| Sulfadimetoxina | 2,5 - 50 | 5 | 0,055 ($\pm 0,001$) | -0,06 ($\pm 0,03$) | 0,997 |
| Sulfaquinoxalina | 10 - 100 | 4 | 0,0123 ($\pm 0,0003$) | -0,05 ($\pm 0,01$) | 0,999 |

* Número de soluções utilizadas para efectuar a recta.

** Valores médios \pm desvio padrão.

*** Coeficiente de correlação.

Tal como para os ensaios com soluções padrão de sulfonamidas com matriz de mel “claro”, as análises de sulfonamidas extraídas de soluções de mistura de padrões de sulfonamidas com matriz de mel “escuro” mostram para a sulfamerazina e a sulfametazina a maior sensibilidade analítica, com declives superiores a 0,0659 kg de mel/ μ g sulfonamida. A sulfonamida com sensibilidade mais baixa foi a sulfaquinoxalina, cuja recta de calibração apresentou um declive de 0,0123 kg de mel/ μ g sulfonamida. As restantes sulfonamidas apresentam declives entre 0,0206 e 0,0590 kg de mel/ μ g sulfonamida.

Os coeficientes de correlação obtidos são superiores a 0,994. Apenas para as sulfonamidas sulfamerazina, sulfametazina e sulfametoxazol se obtiveram coeficientes de correlação bons ($r > 0,999$), enquanto que, para as restantes sulfonamidas são considerados aceitáveis.

Ao nível dos valores da ordenada na origem obtidas nas calibrações de cada sulfonamida, verificou-se que são valores próximos de zero, tal como esperado, excepto para o sulfisoxazol e sulfadoxina que apresentaram valores de 0,22.

Globalmente, os parâmetros da regressão linear obtidos para as 10 sulfonamidas são aceitáveis ao nível de coeficientes de correlação, sensibilidade (com erros pequenos associados à repetição), bem como, das ordenadas na origem obtidas, uma vez que são valores próximos de zero.

Quando comparados os parâmetros das rectas obtidos para os dois tipos de matriz de mel (mel “claro” e mel “escuro”), verificou-se, em geral, uma maior sensibilidade para o mel “escuro” (maiores declives). As correlações obtidas foram, em geral, melhores para a matriz de mel “claro”.

As sensibilidades obtidas nas calibrações para a sulfametoxipiridazina e para sulfadoxina foram superiores às obtidas por Maudens *et al.* (2004), enquanto que nas calibrações do sulfatiazol, sulfamerazina e sulfametazina as sensibilidades obtidas foram inferiores às obtidas pelo referido autor.

3.2.3. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são parâmetros importantes pois, indicam a partir de que concentração a substância em análise se detecta ou é possível ser quantificada, respectivamente.

Para calcular os limites de detecção e de quantificação utilizou-se o erro padrão da ordenada da origem da recta de calibração (s) e o declive da respectiva recta (m). Assim o LD e o LQ foram calculados usando as equações 1 e 2 apresentadas no capítulo 1.4. da validação de métodos analíticos.

Na Tabela 3.4. encontram-se os limites de detecção e de quantificação teóricos obtidos para o método optimizado, calculados através de parâmetros da recta de regressão obtidos com soluções de mistura de padrões de sulfonamidas preparadas com matriz de mel “claro” ou de mel “escuro”.

Tabela 3.4. – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), expressos em $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel, da análise de sulfonamidas em mel “claro” e em mel “escuro” por HPLC-FL.

| Sulfonamida | Matriz de mel “claro” ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel) | | Sulfonamida | Matriz de mel “escuro” ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de mel) | |
|-----------------------|---|-------|-----------------------|--|-------|
| | LD | LQ | | LD | LQ |
| Sulfatiazol | 0,37 | 1,13 | Sulfatiazol | 2,91 | 8,82 |
| Sulfamerazina | 0,42 | 1,28 | Sulfamerazina | 0,90 | 2,74 |
| Sulfametazina | 1,02 | 3,08 | Sulfametazina | 1,22 | 3,72 |
| Sulfametizol | 1,64 | 4,97 | Sulfametizol | 2,34 | 7,10 |
| Sulfametoxipiridazina | 1,09 | 3,32 | Sulfametoxipiridazina | 1,60 | 4,86 |
| Sulfisoxazol | 0,65 | 1,98 | Sulfisoxazol | 2,54 | 7,71 |
| Sulfadoxina | 0,49 | 1,49 | Sulfadoxina | 2,02 | 6,11 |
| Sulfametoxazol | 0,63 | 1,92 | Sulfametoxazol | 1,02 | 3,08 |
| Sulfadimetoxina | 0,35 | 1,05 | Sulfadimetoxina | 2,03 | 6,15 |
| Sulfaquinoxalina | 3,38 | 10,24 | Sulfaquinoxalina | 3,86 | 11,71 |

Os limites de detecção e de quantificação obtidos são superiores para a matriz de “mel escuro”. Os valores obtidos para o LD e LQ usando a recta de calibração preparada com soluções padrão de mistura de sulfonamidas com matriz de mel “claro”, são inferiores aos obtidos por Maudens *et al.* (2004), para o sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina e sulfadoxina. Os valores obtidos para o LD e LQ usando a recta de calibração preparada com soluções padrão de mistura de sulfonamidas com matriz de mel “escuro”, são da mesma ordem de grandeza dos obtidos por Maudens *et al.* (2004) para a sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina e sulfadoxina.

Para verificar os limites de quantificação calculados com parâmetros da recta de calibração, mediu-se repetidamente uma solução padrão de mistura de sulfonamidas com concentrações abaixo mas próximas destes limites calculados. A variação das concentrações calculadas pela curva de calibração, é inferior a 15%, o que leva a concluir que para alguns casos, os limites de quantificação para as sulfonamidas analisadas possam ser inferiores aos limites de quantificação calculados, uma vez que estes dependem dos erros associados à regressão linear.

3.2.4. Selectividade

Para verificar se o método de análise de sulfonamidas por HPLC era selectivo, ou seja, se os picos da resposta correspondiam apenas aos compostos de interesse, extraíram-se, derivatizaram-se e injectaram-se amostras de mel descontaminadas em sulfonamidas (analisadas pelo teste CHARM II), que foram classificadas pela cor segundo o procedimento descrito no anexo A. Foram injectadas 6 amostras de mel classificadas como mel “claro” e 6 amostras de mel classificadas como mel “escuro”. Compararam-se os cromatogramas com o obtido por injeção de amostra de mel em que se adicionou solução padrão de mistura das 11 sulfonamidas.

Na Figura 3.3. apresentam-se cromatogramas típicos de uma amostra de mel “claro” não contaminado, de uma amostra de mel “escuro” não contaminado e de uma amostra de mel “claro” em que se adicionou a solução padrão de mistura das 11 sulfonamidas.

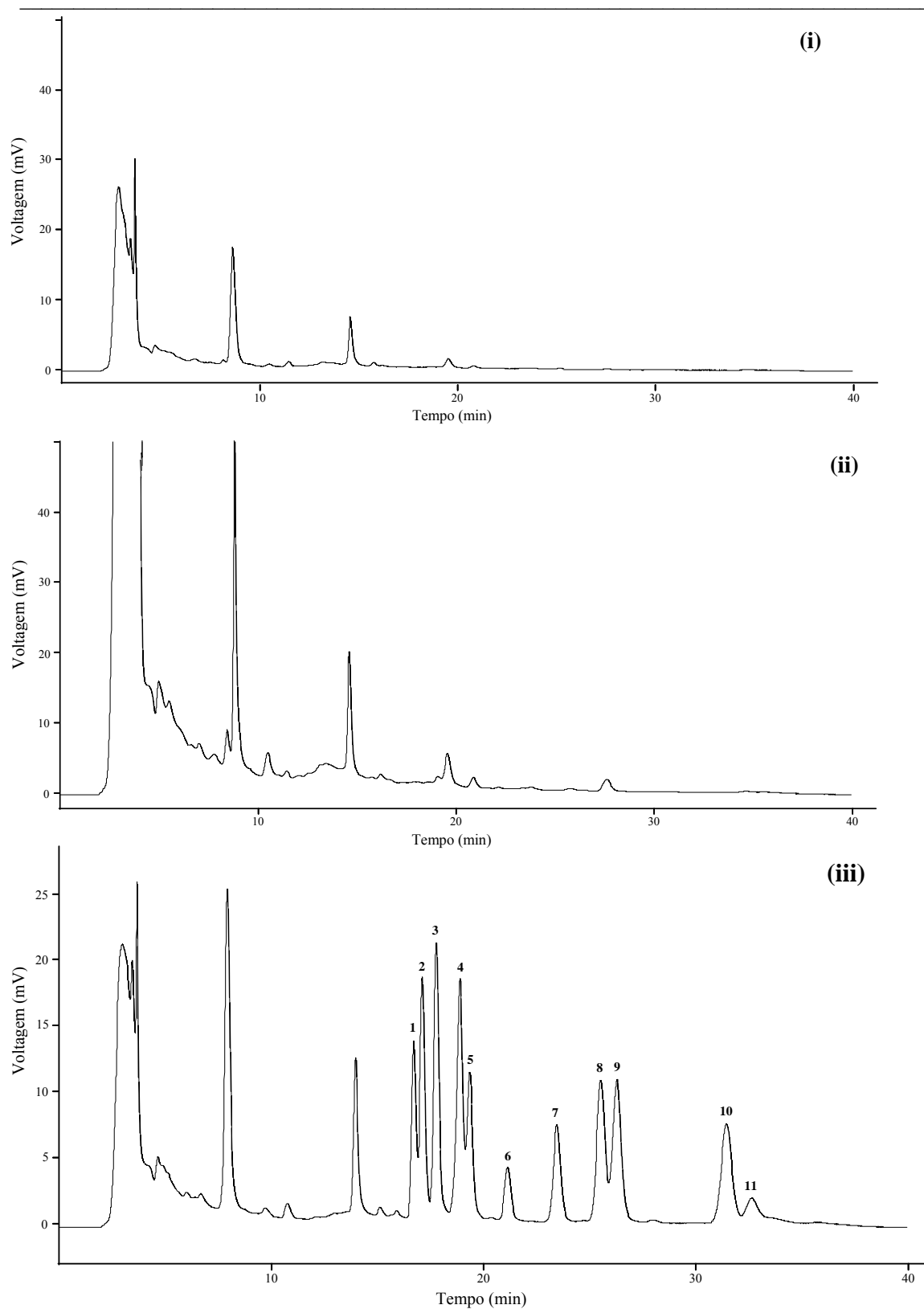


Figura 3.3. – (i) Cromatograma de uma amostra de mel “claro” não contaminado; (ii) Cromatograma de uma amostra de mel “escuro” não contaminado; (iii) Cromatograma de uma amostra de mel “claro” com adição de padrão (20 µg de padrão interno/kg de mel e 75 µg de padrões de sulfonamidas/kg de mel): 1- sulfatiazol, 2- sulfamerazina, 3- sulfametazina, 4-sulfametizol, 5- sulfametoxipiridazina, 6- sulfameter (p.i.), 7- sulfisoxazol, 8- sulfadoxina, 9- sulfametoxazol, 10- sulfadimetoxina, 11- sulfaquinoxalina.

Pela análise dos perfis esboçados na figura anterior pode inferir-se acerca da selectividade do método. O método aplicado permitiu obter para mel “claro” um cromatograma com uma linha de base mais limpa e com menos “ruído” do que a matriz de mel “escuro”. Para a matriz do mel “escuro”, por ser uma matriz mais complexa, não foi possível eliminar todas as interferências, obtendo-se uma linha de base com maior “ruído”. O método optimizado apresenta uma maior selectividade para mel “claro”, do que para mel “escuro”, observando-se no entanto, interferências na zona de eluição das sulfonamidas no cromatograma para a matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro” na zona do sulfametizol e sulfametoxipiridazina e ainda na zona do sulfisoxazol para a matriz de mel “escuro”.

3.2.5. Precisão

A precisão do método foi estudada ao nível da repetibilidade e precisão intermédia. O estudo da repetibilidade do método consistiu na análise de soluções padrão de controlo de qualidade de mistura de sulfonamidas preparadas com matriz de mel, englobando as etapas de extracção e derivatização. Prepararam-se 4 soluções, a partir da solução de mistura de padrões de sulfonamidas; uma com adição 10 µg/kg de mel (solução de controlo de qualidade - SCQ 1) e outra com adição de 25 µg/kg de mel (solução de controlo de qualidade - SCQ 2) com matriz de mel “claro” e com matriz de mel “escuro”. Cada solução foi analisada sete vezes consecutivas. Foi efectuado o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação percentual das áreas dos picos.

Na Tabela 3.5. encontram-se apresentados os resultados obtidos no estudo da repetibilidade usando 2 soluções de controlo de qualidade (SCQ 1, 10 µg de cada sulfonamida/kg de mel e SCQ 2, 25 µg de cada sulfonamida/kg de mel) preparadas com matrizes de mel “claro” e mel “escuro” São apresentados os valores das médias (\pm desvio padrão) e o coeficiente de variação (CV%) das áreas de cada sulfonamida analisada (área de cada sulfonamida/área do p.i.).

Tabela 3.5. – Resultados das áreas dos picos de cada sulfonamida obtidos no estudo da repetibilidade para soluções de controlo de qualidade SCQ 1 e SCQ 2 preparadas com matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro”.

| Matriz de mel “claro” | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| Sulfonamida | SCQ 1 | | SCQ 2 | |
| | Média (± desvio padrão) | CV% | Média (± desvio padrão) | CV% |
| Sulfatiazol | 0,40 (± 0,01) | 2,4 | 1,04 (± 0,01) | 1,4 |
| Sulfamerazina | 0,54 (± 0,01) | 1,8 | 1,354 (± 0,008) | 0,6 |
| Sulfametazina | 0,578 (± 0,007) | 1,2 | 1,50 (± 0,03) | 1,8 |
| Sulfametizol | 0,398 (± 0,008) | 2,0 | 1,17 (± 0,01) | 1,0 |
| Sulfametoxipiridazina | 1,07 (± 0,02) | 2,1 | 1,70 (± 0,02) | 1,0 |
| Sulfisoxazol | 0,306 (± 0,004) | 1,5 | 0,670 (± 0,008) | 1,1 |
| Sulfadoxina | 0,466 (± 0,002) | 0,4 | 1,10 (± 0,01) | 0,9 |
| Sulfametoxazol | 0,469 (± 0,007) | 1,5 | 1,19 (± 0,02) | 1,3 |
| Sulfadimetoxina | 0,396 (± 0,008) | 1,9 | 0,981 (± 0,009) | 0,9 |
| Sulfaquinoxalina | * | * | 0,232 (± 0,007) | 2,9 |

| Matriz de mel “escuro” | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| Sulfonamida | SCQ 1 | | SCQ 2 | |
| | Média (± desvio padrão) | CV% | Média (± desvio padrão) | CV% |
| Sulfatiazol | 0,50 (± 0,03) | 5,6 | 0,88 (± 0,01) | 1,1 |
| Sulfamerazina | 0,627 (± 0,006) | 0,9 | 1,20 (± 0,02) | 1,4 |
| Sulfametazina | 0,54 (± 0,01) | 2,1 | 1,33 (± 0,03) | 2,3 |
| Sulfametizol | 0,52 (± 0,03) | 6,3 | 1,32 (± 0,03) | 2,4 |
| Sulfametoxipiridazina | 0,56 (± 0,02) | 3,3 | 1,00 (± 0,03) | 3,4 |
| Sulfisoxazol | 0,74 (± 0,08) | 11,3 | 0,76 (± 0,01) | 1,4 |
| Sulfadoxina | 0,65 (± 0,03) | 4,6 | 1,16 (± 0,02) | 1,6 |
| Sulfametoxazol | 0,67 (± 0,03) | 4,7 | 1,29 (± 0,03) | 2,5 |
| Sulfadimetoxina | 0,49 (± 0,03) | 5,6 | 0,95 (± 0,03) | 3,2 |
| Sulfaquinoxalina | * | * | 0,137 (± 0,009) | 6,3 |

*Valor não calculado porque a concentração desta solução é inferior ao limite de quantificação para esta substância.

No estudo de repetibilidade, as soluções de controlo de qualidade preparadas com matriz de mel “escuro” mostram resultados com CV% mais elevados do que os obtidos para as soluções de controlo de qualidade usando a matriz de mel “claro”.

Globalmente, os coeficientes de variação obtidos mostram resultados inferiores a 5%, indicando que todas as medições experimentais para a matriz de mel “claro” têm precisões aceitáveis (CV% variam entre 1,0 e 5,0%) ou precisões boas (CV% foram menores que 1%). Só na análise de 4 sulfonamidas, as áreas dos respectivos picos mostraram variabilidades significativas, com CV% a variar entre 5,6 e 11,3%. Na solução de controlo qualidade de mais baixa concentração (SCQ 1, 10 µg/kg de mel) com matriz de mel “escuro” obtiveram-se CV% superiores a 5% para as sulfonamidas sulfatiazol, sulfametizol, sulfisoxazol e sulfadimetoxina indicando que a precisão das análises são fracas, não cumprindo um dos requisitos essenciais das análises quantitativas. Esta situação não se verificou na solução de controlo de qualidade de concentração mais elevada (25 µg/kg de mel), indicando que na análise das sulfonamidas com matriz de mel “escuro”, as interferências da matriz podem ser suficientes para influenciar a quantificação de sulfonamidas a concentrações mais baixas, o que pode ser corroborado com a visualização do cromatograma típico de uma amostra de mel escuro, na Figura 3.3. - (ii), no capítulo referente à selectividade, onde se verifica uma linha de base com mais “ruído”.

A sulfaquinoxalina foi a sulfonamida em que se obteve menor precisão, verificando-se o maior valor de CV%, quer para as soluções de controlo de qualidade com matriz de mel “claro” quer para as com matriz de mel “escuro”. Este comportamento pode ser explicado pelo facto de ser o pico com maior tempo de retenção sofrendo variações maiores do que os restantes.

No geral, os valores obtidos para a repetibilidade são da mesma ordem de grandeza dos obtidos por Posyniak, *et al.* (2003) e Maudens *et al.* (2004).

A precisão intermédia do método foi estudada usando as soluções de controlo de qualidade já referidas no estudo da repetibilidade, analisando as soluções padrão de controlo de qualidade SCQ 1 e SCQ 2 preparadas com matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro”, em seis dias diferentes. Foi efectuado o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação percentual das áreas dos picos de cada sulfonamida analisada.

Na Tabela 3.6. encontram-se apresentados os resultados obtidos no estudo da precisão intermédia usando 2 soluções de controlo de qualidade (SCQ 1, 10 µg de cada sulfonamida/kg de mel e SCQ 2, 25 µg de cada sulfonamida/kg de mel) preparadas com matrizes de mel “claro” e mel “escuro”. São apresentados os valores das médias (\pm desvio padrão) e o coeficiente de variação (CV%) das áreas de cada sulfonamida analisada (área de cada sulfonamida/área do p.i.).

Globalmente, os coeficientes de variação obtidos das áreas dos picos de cada sulfonamida analisada em diferentes dias, mostram resultados inferiores a 20%, indicando que as medições experimentais têm precisões aceitáveis dada a complexidade da matriz e de se tratar de análise de resíduos. Ao contrário do esperado, os melhores resultados no estudo da precisão intermédia foram obtidos para a SCQ 1, com menor concentração de sulfonamidas, preparada quer com matriz de mel “claro” quer com matriz de mel “escuro”. Para a SCQ 2 preparada com matriz de mel “claro” obtiveram-se CV% inferiores a 15%, excepto para a sulfamerazina (15,9%), sulfametoxipiridazina (29,8%) e para o sulfaquinoxalina (17,1%). Nas soluções de controlo de qualidade com matriz de mel “escuro”, os resultados mostram terem CV% semelhantes aos obtidos para as soluções de controlo de qualidade usando a matriz de “mel claro”. Os CV% obtidos foram inferiores a 15% na grande maioria das sulfonamidas, exceptuando para a SCQ 1 o sulfisoxazol e para a SCQ 2 o sulfametizol, sulfametoxipiridazina, e a sulfaquinoxalina, cujos valores de CV% estão entre 15 e 20%. Apenas para o sulfatiazol na SCQ 2 se obteve uma variabilidade superior a 20%, com um valor de CV% de 21,8%.

Tabela 3.6. – Resultados das áreas dos picos de cada sulfonamida obtidos no estudo da precisão intermédia para soluções de controlo de qualidade SCQ 1 e SCQ 2 preparadas com matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro”.

| Matriz de mel “claro” | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| Sulfonamida | SCQ 1 | | SCQ 2 | |
| | Média (± desvio padrão) | CV% | Média (± desvio padrão) | CV% |
| Sulfatiazol | 0,41 (± 0,04) | 9,6 | 0,92 (± 0,09) | 9,6 |
| Sulfamerazina | 0,54 (± 0,04) | 7,9 | 1,2 (± 0,2) | 15,9 |
| Sulfametazina | 0,58 (± 0,06) | 9,8 | 1,3 (± 0,2) | 13,4 |
| Sulfametizol | 0,52 (± 0,07) | 14,1 | 1,1 (± 0,2) | 14,1 |
| Sulfametoxipiridazina | 0,36 (± 0,04) | 12,1 | 0,6 (± 0,2) | 29,8 |
| Sulfisoxazol | 0,33 (± 0,05) | 16,2 | 0,64 (± 0,08) | 12,4 |
| Sulfadoxina | 0,48 (± 0,04) | 7,9 | 1,01 (± 0,08) | 11,7 |
| Sulfametoxazol | 0,50 (± 0,04) | 9,2 | 1,1 (± 0,1) | 11,5 |
| Sulfadimetoxina | 0,47 (± 0,05) | 11,3 | 0,9 (± 0,1) | 13,7 |
| Sulfaquinoxalina | * | * | 0,24 (± 0,04) | 17,1 |

| Matriz de mel “escuro” | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| Sulfonamida | SCQ 1 | | SCQ 2 | |
| | Média (± desvio padrão) | CV% | Média (± desvio padrão) | CV% |
| Sulfatiazol | 0,58 (± 0,04) | 7,1 | 1,0 (± 0,2) | 21,8 |
| Sulfamerazina | 0,78 (± 0,06) | 8,1 | 1,3 (± 0,2) | 11,6 |
| Sulfametazina | 0,68 (± 0,09) | 13,5 | 1,4 (± 0,2) | 14,5 |
| Sulfametizol | 0,49 (± 0,03) | 6,1 | 1,0 (± 0,2) | 18,7 |
| Sulfametoxipiridazina | 0,52 (± 0,06) | 10,5 | 0,1 (± 0,2) | 17,5 |
| Sulfisoxazol | 0,51 (± 0,09) | 18,7 | 0,84 (± 0,05) | 6,2 |
| Sulfadoxina | 0,80 (± 0,04) | 5,0 | 1,28 (± 0,2) | 14,8 |
| Sulfametoxazol | 0,65 (± 0,04) | 6,4 | 1,35 (± 0,07) | 4,9 |
| Sulfadimetoxina | 0,51 (± 0,06) | 12,8 | 1,09 (± 0,03) | 3,1 |
| Sulfaquinoxalina | * | * | 0,26 (± 0,04) | 16,5 |

*Valor não calculado porque a concentração desta solução é inferior ao limite de quantificação para esta substância.

Para avaliar a precisão das análises de amostras de mel estudou-se a repetibilidade e a precisão intermédia. Efectuou-se a extracção em triplicado de uma amostra de mel “claro” e de uma amostra de mel “escuro”, que se encontravam contaminadas com sulfatiazol (contaminação confirmada pelo teste CHARM II). Os extractos das amostras de mel, derivatizadas, foram analisados três vezes consecutivas no mesmo dia e em 2 dias diferentes.

Na Tabela 3.7. encontram-se os resultados da média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das concentrações de sulfatiazol medidas nas amostras de mel contaminadas, no estudo da repetibilidade e precisão intermédia.

Tabela 3.7. – Repetibilidade e precisão intermédia do método de análise na quantificação do sulfatiazol em amostras de mel “claro” e de mel “escuro”.

| Ensaio | Mel “claro” – Sulfatiazol * | | |
|--------------------|-----------------------------|---|------|
| | n | Média (µg/kg de mel) (± desvio padrão) | CV% |
| No mesmo dia | 9 | 64 (± 2) | 3,9 |
| Em dias diferentes | 18 | 72 (± 9) | 12,9 |
| Ensaio | Mel “escuro” – Sulfatiazol | | |
| | n | Média (µg/kg de mel) (± desvio padrão) | CV% |
| No mesmo dia | 9 | 7,6 (± 0,4) | 6,0 |
| Em dias diferentes | 18 | 8,1 (± 0,9) | 10,9 |

n – nº de injecções total (3 injecções por amostra)

* Para efectuar a quantificação desta amostra usou-se recta de calibração de 1-100 µg/kg de mel.

Globalmente, os coeficientes de variação obtidos para as amostras de mel analisadas mostram resultados inferiores a 15%, indicando que as medições experimentais têm precisões aceitáveis dada a complexidade da matriz e de se tratar de análise de resíduos. Foram obtidas precisões da mesma ordem de grandeza para a amostra de mel “claro” e para amostra de mel “escuro”, mesmo tratando-se de níveis de contaminação diferentes.

No estudo da repetibilidade, análises realizadas no mesmo dia, obtiveram-se valores de coeficientes de variação na ordem dos 6%, mesmo tratando-se de extracções diferentes. Nas análises realizadas em dias diferentes, estudo da precisão intermédia, obtiveram-se coeficientes de variação inferiores a 13%. Comparando com a variabilidade obtida para o sulfatiazol nas SCQ, obtiveram-se coeficientes de variação

superiores para a repetibilidade e da mesma ordem de grandeza, para a precisão intermédia.

3.2.6. Exactidão

A exactidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação. Foram adicionadas soluções padrão de mistura de sulfonamidas de 10 e 25 µg de cada sulfonamida/kg de mel à matriz de mel isenta de sulfonamidas. Estas amostras de mel contaminadas com mistura de padrões de sulfonamidas foram extraídas e derivatizadas, como referido no sub-capítulos 2.2.6. e 2.2.7. As amostras preparadas foram injectadas em seis dias diferentes. Foram efectuados ensaios para matriz de mel “claro” e matriz de mel “escuro” e determinadas as concentrações de cada sulfonamida. Na Tabela 3.8. são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de recuperação, considerando a relação percentual entre a concentração da sulfonamida medida experimentalmente e a esperada obter. São apresentadas as médias e os CV%.

Em geral, os níveis de recuperação obtidos encontram-se entre 70-120%, com um coeficiente de variação inferior a 20%. Verificou-se também que os valores de recuperação são superiores para os ensaios com amostras de mel contaminadas com sulfonamidas de concentrações de 10 µg/kg de mel.

Para os ensaios com matriz de mel “claro” obtiveram-se valores de recuperação entre 80 e 113%, com CV%, em geral, até 15%. O sulfametizol apresentou uma recuperação de 140% para a concentração de 10 µg/kg de mel, o que pode ser devido a interferências na zona de eluição deste pico, corroborado pela visualização na Figura 3.3. – (i) do cromatograma de amostra de mel “claro” no sub-capítulo 3.2.4. referente à selectividade.

Para os ensaios de recuperação com a matriz de mel “escuro” obtiveram-se valores de recuperação entre 70 e 121%, com CV%, em geral, até 20%. O sulfisoxazol apresentou uma recuperação extremamente elevada para as duas concentrações (242% e 161%), o que pode ser explicado por interferências na zona de eluição deste pico, corroborado pela visualização na Figura 3.3. – (ii) do cromatograma de amostra de mel “escuro” no sub-capítulo 3.2.4. referente à selectividade.

Tabela 3.8. – Resultados dos ensaios de recuperação usando soluções padrão de mistura de sulfonamidas preparadas com matriz de mel “claro” ou matriz de mel “escuro”.

| Matriz de mel “claro” | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|
| Sulfonamida | 10 µg/kg de mel | 25 µg/kg de mel |
| | Média (CV%) | Média (CV%) |
| Sulfatiazol | 98 (9,5) | 88 (9,5) |
| Sulfamerazina | 96 (7,9) | 80 (15,9) |
| Sulfametazina | 101 (9,5) | 87 (13,2) |
| Sulfametizol | 140 (9,6) | 113 (13,6) |
| Sulfametoxipiridazina | 112 (12,4) | 76 (30,4) |
| Sulfisoxazol | 102 (20,6) | 87 (14,0) |
| Sulfadoxina | 104 (8,1) | 87 (11,9) |
| Sulfametoxazol | 106 (9,7) | 92 (11,8) |
| Sulfadimetoxina | 113 (11,5) | 89 (13,9) |
| Sulfaquinoxalina | * | 78 (20,6) |

| Matriz de mel “escuro” | | |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| Sulfonamida | 10 µg/kg de mel | 25 µg/kg de mel |
| | Média (CV%) | Média (CV%) |
| Sulfatiazol | 94 (8,4) | 73 (24,2) |
| Sulfamerazina | 113 (8,8) | 77 (12,6) |
| Sulfametazina | 121 (11,2) | 92 (13,5) |
| Sulfametizol | 121 (6,3) | 99 (18,9) |
| Sulfametoxipiridazina | 81 (11,6) | 69 (14,5) |
| Sulfisoxazol | 242 (19,5) | 161 (5,2) |
| Sulfadoxina | 94 (6,78) | 70 (18,3) |
| Sulfametoxazol | 104 (6,28) | 88 (5,4) |
| Sulfadimetoxina | 105 (11,4) | 85 (3,1) |
| Sulfaquinoxalina | * | 105 (13,6) |

*Valor não calculado porque a concentração desta solução é inferior ao limite de quantificação para esta substância.

Os valores de recuperação obtidos, no geral, encontram-se dentro de valores aceitáveis. Ribani *et al.*, (2004) refere que os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente encontram-se entre 70 e 120% (com coeficientes de variação menores que 20%), e dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120% (com coeficientes de variação menores que 15%).

Foi ainda avaliada a exactidão quando a amostra de mel se encontra contaminada apenas com uma sulfonamida. Prepararam-se 2 amostras de mel contaminadas por adição de solução padrão de sulfatiazol de forma a obter a concentração de 10 µg/kg de mel, usando um mel de matriz de mel “claro” e outro mel de matriz de mel “escuro”. A extracção do sulfatiazol das 2 amostras de mel, preparadas para o estudo da exactidão, foi efectuada em triplicado e analisadas por HPLC e por CHARM II, com resultado positivo. Na Tabela 3.9. encontram-se os resultados obtidos para os referidos ensaios.

Tabela 3.9. – Resultados dos ensaios de recuperação do sulfatiazol em mel de matriz de mel “claro” e de matriz de mel “escuro” contaminado com 10 µg de sulfatiazol/kg de mel.

| Mel “claro” | | | |
|---------------------|--|--|-------------------------------|
| Ensaio | Quantidade Adicionada (µg de sulfatiazol/kg de mel) | Quantidade Medida (µg de sulfatiazol/kg de mel) (Média ± s) | %recuperação (CV%) |
| Sulfatiazol | 9,8 | 9,3 (± 0,2) | 95 (2,8) |
| Mel “escuro” | | | |
| Ensaio | Quantidade Adicionada (µg de sulfatiazol/kg de mel) | Quantidade Medida (µg de sulfatiazol/kg de mel) (Média ± s) | %recuperação (CV%) |
| Sulfatiazol | 9,8 | 8,1 (± 0,2) | 82 (3,1) |

A percentagem de recuperação obtida para o sulfatiazol extraído de uma matriz de mel “claro” foi de 95% e de uma matriz de mel “escuro” foi de 82%. A percentagem de recuperação do sulfatiazol medida quer no mel “claro”, quer no mel “escuro”, encontra-se de acordo com a obtida no estudo da recuperação quando se usou a mistura de padrões de sulfonamidas, sendo da mesma ordem de grandeza. A precisão dos resultados obtidos é considerada de boa (CV% ≈ 3%) e comparável à obtida para os ensaios de precisão com amostras de mel contaminadas.

Foram também efectuados ensaios de adição de padrão de sulfatiazol a amostras de mel que já se encontravam contaminadas com sulfatiazol. Por contaminação com solução padrão de sulfatiazol, adicionaram-se 25 µg de sulfatiazol/kg de mel, a uma amostra de mel “claro” e a outra amostra de mel “escuro”. Cinco amostras de cada mel (“claro” e “escuro”) com adição de padrão foram extraídas e derivatizadas. Os resultados das análises foram comparados com os obtidos com o extracto da amostra de mel sem adição de padrão. A percentagem de recuperação obtida para amostras de mel “claro” foi de 70%, com um CV% de 6%, e para as amostras de mel “escuro” foi de 96%, com um CV% de 4%. A percentagem de recuperação obtida para a matriz de mel “escuro” encontra-se de acordo com os resultados anteriormente obtidos. No caso da matriz de mel “claro” obteve-se uma percentagem de recuperação baixa em relação ao esperado. Este resultado pode ser atribuído ao facto da amostra usada ter níveis de contaminação bastante elevados (a adição de padrão corresponde a 1/3 da concentração de sulfatiazol já existente) afectando a capacidade de extracção da coluna SPE-C18. As contaminações envolvidas neste ensaio foram superiores a 50 µg/kg de mel.

3.3. ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL

A análise de sulfonamidas em amostras de mel foi efectuada usando 2 métodos: o método qualitativo, teste CHARM II, que permite identificar quais as amostras de mel com contaminação em sulfonamidas; o método quantitativo, optimizado e validado, HPLC-FL, para identificar e quantificar as sulfonamidas presentes nos méis contaminados com sulfonamidas.

3.3.1. Análise de sulfonamidas por CHARM II

O teste CHARM II permite analisar a presença de sulfonamidas em amostras de mel de forma qualitativa, ou seja, permite verificar se há ou não a presença de sulfonamidas no mel. É um método que detecta, de forma acumulativa, a presença de 17 compostos do grupo das sulfonamidas e os seus metabolitos, com um limite de detecção de 10 µg/kg de mel para a generalidade dos compostos. No anexo C apresentam-se as sulfonamidas detectadas pelo teste CHARM II e os seus limites de detecção. Este método é usado como referência pela US-FDA.

Analisaram-se 397 amostras de mel fornecidas por 31 Associações de Apicultores de praticamente todas as regiões de Portugal, associadas a 3 anos apícolas de produção (2005, 2006 e 2007). Na Tabela 3.10. apresentam-se os resultados obtidos para as amostras de mel analisadas pelo método de CHARM II, distribuídos por anos apícolas.

Tabela 3.10. – Níveis de contaminação de sulfonamidas em amostras de mel analisadas pelo método CHARM II.

| Ano Apícola | 2005 | 2006 | 2007 |
|--|-------------|-------------|-------------|
| Número de amostras analisadas | 157 | 125 | 115 |
| Número de amostras contaminadas | 36 | 38 | 29 |
| % contaminação | 22,9 | 30,4 | 25,2 |

Globalmente, obtiveram-se níveis de contaminação de sulfonamidas, no mel nacional, elevados com uma percentagem média de 26,2% para os três anos apícolas.

As amostras de mel que deram resultados positivos em sulfonamidas pelo teste CHARM II foram analisadas pelo método optimizado e validado de HPLC-FL.

3.3.2. Análise de sulfonamidas por HPLC-Fluorescência

Pelo método de análise de sulfonamidas por HPLC-FL foram analisadas 103 amostras de mel contaminadas em sulfonamidas (previamente analisadas por CHARM II). A quantificação das amostras foi efectuada através das rectas de calibração tendo em conta a cor da amostra, determinada segundo o procedimento descrito no anexo A.

Das 103 amostras de mel com resultados positivos em sulfonamidas no teste CHARM II, apenas em 53 amostras se conseguiram detectar e/ou quantificar sulfonamidas pelo método de HPLC-FL.

Na Tabela 3.11. mostram-se os resultados das análises às amostras de mel contaminadas com sulfonamidas, cujas análises por HPLC-FL permitiram detectar e/ou quantificar sulfonamidas nas amostras de mel. Nas restantes amostras de mel não foram detectadas quaisquer presenças de sulfonamidas.

Verificou-se uma predominância de amostras de mel de cor “claro”, das 103 amostras analisadas; 75 amostras de mel apresentaram cor definida como mel “claro” e 28 amostras de mel, cor de mel “escuro”. Nas amostras de mel cuja contaminação em

sulfonamidas foi verificada por HPLC-FL, verificou-se também a mesma predominância. As amostras de mel foram analisadas segundo a cor apresentada, usando a calibração efectuada com matriz de mel “claro” ou com matriz de mel “escuro”. Os níveis de contaminação em sulfonamidas encontrados nas amostras de mel analisadas são, em geral, baixos (concentrações < 10 µg/kg de mel). Apenas em 6 amostras de mel se encontraram níveis de contaminação em sulfonamidas superiores a 10 µg/kg de mel. Em 18 amostras de mel o nível de contaminação de sulfonamidas encontra-se abaixo do limite de quantificação, sendo apenas detectada a presença destes compostos.

A sulfonamida mais frequente nas amostras de mel contaminadas foi o sulfatiazol. Os compostos sulfametizol, sulfamerazina, sulfisoxazol e sulfametoxipiridazina também foram encontrados, com menor frequência, nas amostras de mel analisadas.

Tabela 3.11. – Resultados obtidos das análises às amostras de mel por HPLC-FL, em função da cor do mel.

| Amostra | Cor | Resultado | | Amostra | Cor | Resultado | |
|---------|--------|-----------------------------|------------------------------------|---------|--------|-----------------------------|------------------------------------|
| | | Concentração (µg/kg de mel) | Sulfonamida detectada/quantificada | | | Concentração (µg/kg de mel) | Sulfonamida detectada/quantificada |
| 1 | claro | 1,6 | sulfatiazol | 30 | claro | 4,6 | sulfatiazol |
| 2 | claro | 4,4 | sulfatiazol | 31 | claro | detectado | sulfisoxazol |
| 3 | claro | 7,5 | sulfatiazol | 32 | escuro | detectado | sulfatiazol |
| 4 | claro | detectado | sulfametizol | 33 | escuro | detectado | sulfisoxazol |
| 5 | escuro | 22,1 | sulfatiazol | 34 | claro | 2,4 | sulfatiazol |
| 6 | claro | 1,4 | sulfatiazol | 35 | escuro | detectado | sulfatiazol |
| 7 | claro | 6,7 | sulfatiazol | 36 | escuro | detectado | sulfatiazol |
| 8 | claro | 1,6 | sulfatiazol | 37 | claro | 5,7 | sulfatiazol |
| 9 | claro | 4,2 | sulfatiazol | 38 | claro | 1,7 | sulfamerazina |
| 10 | claro | 5,5 | sulfatiazol | 39 | escuro | 10,4 | sulfametizol |
| 11 | escuro | 8,9 | sulfatiazol | 40 | escuro | detectado | sulfatiazol |
| 12 | escuro | detectado | sulfatiazol | 41 | claro | 4,2 | sulfatiazol |
| 13 | escuro | detectado | sulfatiazol | 42 | claro | detectado | sulfatiazol |
| 14 | claro | 7,8 | sulfatiazol | 43 | claro | 2,2 | sulfatiazol |
| 15 | escuro | detectado | sulfatiazol | 44 | claro | 2,1 | sulfatiazol |
| 16 | escuro | 19,3 | sulfatiazol | 45 | escuro | 8,7 | sulfametizol |
| 17 | claro | 1,9 | sulfatiazol | | | 2,9 | sulfatiazol |
| 18 | claro | 4,5 | sulfatiazol | 46 | claro | detectado | sulfametizol |
| 19 | claro | 18,9 | sulfatiazol | | | detectado | sulfametoxipiridazina |
| 20 | claro | 3,3 | sulfatiazol | 47 | escuro | detectado | sulfatiazol |
| 21 | claro | 4,6 | sulfatiazol | | | detectado | sulfametizol |
| 22 | claro | 8,7 | sulfatiazol | 48 | escuro | detectado | sulfatiazol |
| 23 | claro | detectado | sulfatiazol | | | detectado | sulfamerazina |
| 24 | claro | 1,5 | sulfatiazol | 49 | claro | detectado | sulfametizol |
| 25 | claro | 2,6 | sulfamerazina | 50 | claro | detectado | sulfatiazol |
| 26 | claro | 73,0 | sulfatiazol | 51 | claro | 1,3 | sulfatiazol |
| 27 | claro | 10,5 | sulfatiazol | 52 | claro | detectado | sulfatiazol |
| 28 | claro | 10,0 | sulfatiazol | 53 | claro | 5,8 | sulfatiazol |
| 29 | claro | 2,7 | sulfatiazol | | | | |

* As amostras cujo resultado é encontra como “detectado”, são amostras onde não foi possível efectuar a quantificação dado que as concentrações se encontram abaixo de limite de quantificação.

Globalmente, apenas 51% das amostras de mel contaminadas com sulfonamidas segundo os resultados obtidos pelo teste CHARM II, deram resultados positivos com o método optimizado e validado de HPLC-FL para análise de sulfonamidas em mel. Estes resultados poderão ser explicados atendendo a 3 factos: o teste CHARM II analisa de forma acumulativa a presença dos compostos do grupo das sulfonamidas no mel, analisa um maior número de sulfonamidas e também, detecta a presença de metabolitos das sulfonamidas. O teste CHARM II é sensível à presença de outros compostos existentes no mel (como o PABA), podendo dar resultados “falsos positivos”, como referido na bibliografia por Bogdanov (2003). Para confirmar estes resultados “falsos positivos” poderia usar-se o LC-MS como método de confirmação.

CAPÍTULO 4
CONCLUSÕES

O objectivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar um método analítico por HPLC–FL para analisar simultaneamente 11 sulfonamidas em amostras de mel: sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxipiridazina, sulfisoxazol, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e sulfameter (padrão interno). Verificou-se que o mel apresenta uma matriz bastante complexa que afecta o processo de extracção das sulfonamidas e a sua análise por HPLC. Verificou-se também que este efeito de matriz do mel depende da cor do mel, distinguindo-se experimentalmente os efeitos de matriz do mel “claro” dos efeitos do mel “escuro”. Estes factos levaram à selecção do método de calibração por sobreposição de matriz de mel para a análise de sulfonamidas em mel.

Para verificar o desempenho do método analítico optimizado, foram efectuadas calibrações usando soluções padrão de calibração para mistura de sulfonamidas preparadas em matriz de mel “claro” ou matriz de mel “escuro”. A preparação requer um processo de extracção das sulfonamidas em mel, tal como, as amostras de mel. As sensibilidades de cada sulfonamida, obtidas nas medições usando a matriz de mel “claro” ou matriz de mel “escuro”, foram diferentes para a maior parte das sulfonamidas, tendo-se verificado maiores sensibilidades para as sulfonamidas em matriz de mel “escuro”.

No estudo da linearidade, as sulfonamidas analisadas apresentaram, em geral, uma relação linear, entre a área do pico no cromatograma e a concentração da respectiva sulfonamida no mel, no intervalo de concentrações de 1 a 100 µg de sulfonamida/kg de mel. Globalmente, os parâmetros da regressão linear obtidos para as 10 sulfonamidas são aceitáveis ao nível dos coeficientes de correlação, sensibilidade (com erros pequenos associados à repetição), bem como, das ordenadas na origem obtidas, uma vez que são valores próximos de zero. Obtiveram-se coeficientes de correlação, em geral, bons ($r > 0,9990$) para as calibrações efectuadas com soluções de matriz de mel “claro” e aceitáveis ($0,995 < r < 0,9990$) para as calibrações efectuadas com soluções de matriz de mel “escuro”. Os limites de detecção e quantificação para cada uma das sulfonamidas analisadas em soluções com matriz de mel “claro” foram da ordem dos 0,4-1,6 µg/kg de mel e 1-5 µg/kg de mel, respectivamente. Para as sulfonamidas analisadas em soluções com matriz de mel “escuro”, os limites de detecção e de quantificação foram, em geral, superiores e na ordem dos 0,9-2,9 µg/kg de mel e 2,7-8,8 µg/kg de mel, respectivamente. Para a sulfonamida sulfaquinoxalina, os limites de detecção e

quantificação obtidos foram superiores aos das restantes sulfonamidas (quer nos ensaios com matriz de mel “claro” quer nos de mel “escuro”), sendo da ordem de 4,0 e 11,7 µg/kg de mel, respectivamente.

Ao nível dos cromatogramas obteve-se uma linha de base mais limpa e com menos “ruído” nas soluções com matriz de mel “claro”, verificando-se assim que o método analítico apresenta uma maior selectividade para mel “claro” do que para o mel “escuro”.

O método de HPLC otimizado apresentou repetibilidades aceitáveis, com CV%, em geral, inferiores a 2,9% para soluções de matriz de mel “claro” e 5,6% para soluções de matriz de mel “escuro”. Na precisão intermédia obtiveram-se CV%, em geral, inferiores a 17,1% para soluções de matriz de mel “claro” e 18,7% para soluções de matriz de mel “escuro”. No estudo da precisão da extracção do sulfatiazol presente em mel “claro” ou em mel “escuro” obtiveram-se CV% para análises realizadas no mesmo dia de 3,9% e 6,0%, respectivamente, e para análises realizadas em dias diferentes, CV% de 12,9% e 10,9%, respectivamente. Os resultados indicam que as medições experimentais têm precisões aceitáveis dada a complexidade da matriz e de se tratar de análises de resíduos.

As percentagens de recuperação de sulfonamidas em ensaios com matriz de mel “claro” foram, em geral, de 80-113%, tendo-se obtido CV% até 15%, nas repetições das extracções. Para ensaios com matriz de mel “escuro”, as percentagens de recuperação obtidas foram, em geral, de 70-121%, com CV% até 20%. Nos ensaios de recuperação realizados no mel contaminado somente com sulfatiazol, obtiveram-se valores da mesma ordem de grandeza dos obtidos com soluções de mistura de padrões, para ambas as matrizes de mel. Nos ensaios de adição de padrão de sulfatiazol a amostras de mel já contaminadas com sulfatiazol, obtiveram-se valores de recuperação inferiores aos esperados (70%) para o mel “claro”, que pode ser atribuído ao facto de a amostra já ter níveis de contaminação bastante elevados, afectando a capacidade de extracção da coluna SPE-C18. Nos ensaios de adição de padrão para o mel “escuro” obtiveram-se valores de percentagem de recuperação (96%) da mesma ordem de grandeza dos restantes ensaios de recuperação para o sulfatiazol. Os valores obtidos dos ensaios de recuperação mostram que, em geral, o método apresenta exactidão aceitável, uma vez que os valores de percentagem de recuperação obtidos se encontram dentro dos valores referidos na bibliografia por Ribani *et al.*, (2004) (70-120%, com CV% até 20% para

análise de resíduos e dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ir até 50-120%, com CV% de 15%).

Estes estudos mostraram que o método de HPLC desenvolvido para análise de sulfonamidas em mel apresenta grau de linearidade adequado, exactidão e precisão aceitáveis. Os resultados do estudo da validação confirmam a adequabilidade do procedimento analítico para a identificação e quantificação das sulfonamidas em mel.

Da análise de 397 amostras de mel, dos anos apícolas 2005-2007 de quase todas as regiões de Portugal, pelo teste CHARM II (método qualitativo que serve para separar as amostras de mel com contaminações em sulfonamidas para, posteriormente, serem analisadas por outro método instrumental para identificação e quantificação da contaminação presente) obtiveram-se 26,3% dos méis com contaminação em sulfonamidas.

O método HPLC-FL desenvolvido e optimizado apenas conseguiu confirmar 51% dos resultados obtidos pelo teste CHARM II. A sulfonamida mais frequentemente encontrada nas amostras de mel foi o sulfatiazol, tendo-se encontrado também, de forma pontual, a sulfametizol, sulfamerazina, sulfisoxazol e sulfametoxipiridazina. Os níveis de contaminação de sulfonamidas no mel foram, em geral, baixos.

Esta discrepância, no número de amostras de mel contaminadas com sulfonamidas, entre os dois métodos de análise pode ser explicada pelo facto de o teste CHARM II analisar um maior número de sulfonamidas e de forma acumulativa (com um limite de detecção de 10µg/kg de mel para a soma de todos os compostos), bem como, detectar a presença dos metabolitos de sulfonamidas nas amostras de mel. O teste CHARM II é ainda sensível à presença de outros compostos existentes no mel, como o PABA, podendo fornecer resultados “falsos positivos”, como referido por Bogdanov (2003).

Para confirmar os resultados positivos de contaminação em sulfonamidas fornecidos pelo teste CHARM II, nas amostras de mel cujas análises pelo método analítico optimizado e validade de HPLC-FL não indicaram qualquer contaminação, deveria-se usar o sistema analítico LC-MS como método final de confirmação. Na bibliografia, este sistema é considerado como o recurso final para a identificação e quantificação da sulfonamida de contaminação no mel um vez que é um método analítico que está orientado para a detecção e identificação específica de uma substância na presença de outras substâncias.

Globalmente, o sistema HPLC-FL desenvolvido para análise de sulfonamidas em mel apresenta parâmetros de desempenho analítico aceitáveis mostrando estar em condições de ser usado na análise de sulfonamidas em amostras de mel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaburda, J., Ruvieri, V., Shundo, L., Almeida, A.P., Tiglea, P., Sabino, M., (2007), “Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pré-coluna e detecção por fluorescência”, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, pp. 1587-1592.
- Bertoncej, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T., (2007), “Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey”, *Food Chemistry*, 105, pp. 822-828.
- Bogdanov, S., (2003), “Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products”, *Apiacta*, 38, pp. 190-197.
- Bogdanov, S., (2006), “Contaminants of bee products”, *Apidologie*, 37, pp. 1-18.
- Cai, Z., Zhang, Y., Pan, H., Tie, X., Ren, Y., (2008), “Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1200, pp. 144-155.
- Debayle, D., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.F., (2008), “Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, pp. 1011-1020.
- Emer, J., Miller, J.H.M. (editores), (2005), “Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice”, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, ISBN: 3-527-31255-2.
- Gallina, A., Beneti, C., Biancotto, G., Baggio, A., Manzinello, C., Dainese, N., Mutinelli, F., (2005), “Antibiotics residues in honey: Validation procedure”, *Apiacta*, 40, pp. 45-49.
- Granja, R.H.M.M., Niño, A.M.M., Rabone, F., Salerno, A.G., (2008), “A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the

- determination of sulfonamides in honey”, *Analytica Chimica Acta*, 613, pp. 116-119.
- Kaufmann, A., Roth, S., Ryser, B., Widmer, M., (2002), “Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey”, *Journal of AOAC International*, 85, pp. 853-860.
 - Kellner, R., Mermet, J.-M., Otto, M., Widmer, H.M. (editores) (1998), “Analytical chemistry”, Liquid chromatography, WILEY-VCH, Weinheim, 1ª edição, Capítulo 5.3, pp.185-208.
 - Krivohlavek, A., Šmit, Z., Baštinac, M., Žuntar, I., Plavšić- Plavšić, F., (2005), “The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography-mass spectrometry method (LC/MS)”, *Journal of Separation Science*, 28, pp. 1434-1439.
 - Maudens, K.E., Zhang, G.F., Lambert, W.E., (2004), “Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection”, *Journal of Chromatography A*, 1047, pp. 85-92.
 - Mohamed, R., Hammel, Y.A., LeBreton, M.H., Tabet, J.C., Jullien, L., Guy, P.A., (2007), “Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulphonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques”, *Journal of Chromatography A*, 1160, pp. 194-205.
 - Montenegro, S.B., Avallone, C.M., Crazov, A., Aztarbe, M., (2005), “Variación del color en miel de abejas (*Apis mellifera*)”, *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005*, Universidad Nacional del Nordeste, Resumen: T-070.
 - Niessen, W.M.A., (1998), “Analysis of antibiotics by liquid chromatography – mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 812, pp. 53-75.
 - Pang, G.F., Cao, Y.Z., Fan, C.L., Zhang J.J., Li, Z.Y, Jia, G.Q., (2003), “Liquid Chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulphonamide residues in honey”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, pp. 534-541.
 - Pang, G.F., Cao, Y.Z., Zhang, J.J., Jia, G.Q., Fan, C.L., Li, X.M., Liu, Y.M., Li, Z.Y., Shi, Y.Q., (2005), “Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry”, *Journal of AOAC International*, 88, pp. 1304-1311.

-
- Pereira, S.G., (2003), “Detecção e quantificação de antibióticos no mel por HPLC”, *Relatório de fim de Curso em Engenharia Biotecnológica*, Escola Superior Agrária de Bragança.
 - Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J., Sniegocki, T., Grzebalska, A., (2003), “Sulfonamid residues in honey. Control and development of analytical procedure”, *Apiacta*, 38, pp. 249-256.
 - Posyniak, A., Jażdżewski, K., Pietruszka, K., Mitrowska, K., Gajda, A., (2008), “Improved analytical procedure for the determination of sulfonamides in honey”, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52, pp. 87-91.
 - Reybroeck, W., (2003), “Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian Market”, *Apiacta*, 38, pp. 23-30.
 - Regulamento CEE N.º. 2377/90, “Establishment of maximum residue levels of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin”, *Official Journal of the European Communities*, L224/1.
 - Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., (2004), “Validação de métodos cromatográficos e electroforéticos”, *Química Nova*, 27, 5, pp. 771-780.
 - Salter, R., (2003), “CHARM II System- Comprehensive residue analysis system for honey”, *Apiacta*, 38, pp. 198-2006.
 - Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S., Rice, D., (2008), “Analysis and occurrence of the 14 sulfonamide antibacterials and chloranphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 3509-3516.
 - Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., (1997), “Practical HPLC method development”, Preparing buffered mobile phases, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 2ª edição, Apêndice IV, pp. 735-739.
 - Stolker, A.A.M, Brinkman, U.A.T., (2005), “Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review”, *Journal of Chromatography A*, 1067, pp. 15-53.
 - Thompson, T.S., Noot, D.K., (2005), “Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 551, pp. 168-176.

- Wang, S., Zhang, L., Duan, Z.J., Kennedy, I., (2006), “Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review”, *Food Additives and Contaminants*, 23, pp. 362-384.
- Zheng, M.M., Zhang, M.Y., Peng, G.Y., Feng, Y.Q., (2008), “Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 625, pp. 160-172.
- Zotou, A., Vasiliadou, C., (2006), “Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection”, *Chromatographia*, 64, 307-311.
- Zou, Q.H., Wang, J., Wang, X.F., Liu, Y., Han, J., Hou, F., Xie, M.X., (2008), “Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey”, *Journal of AOAC International*, 91, pp. 252-258.

ANEXOS

ANEXO A – PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DA COR EM AMOSTRAS DE
MEL

ANEXO B – PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE SULFONAMIDAS EM
AMOSTRAS DE MEL POR CHARM II

ANEXO C – SULFONAMIDAS DETECTADAS PELO TESTE CHARM II E
SEUS LIMITES DE DETECÇÃO

ANEXO A

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DA COR EM AMOSTRAS DE MEL

O método utilizado para analisar a cor do mel foi o método espectrofotométrico, desenvolvido pelo Prof. Mario Bianchi (Montenegro *et al.*, 2005).

Preparação da amostra:

Pesaram-se 5 gramas de mel num tubo de falcon de 50 ml e dissolveu-se em 10 ml de água desionizada;

Colocou-se a solução preparada numa cuvete de plástico e deixou-se repousar durante 10 a 15 minutos antes de efectuar a leitura;

Leu-se a absorvância num espectrofotómetro, a 650 nm, usando como branco água desionizada.

Para a obtenção da cor do mel calculou-se o valor em mm Pfund a partir do valor da absorvância e aplicou-se a seguinte expressão:

$$\text{mm Pfund} = -38,70 + 371,39 \times \text{Absorvância}$$

Após o cálculo dos mm PFund utilizou-se a Tabela A.1. para fazer a correspondência com a cor do mel.

Tabela A.1. - Comparação entre a cor, mm Pfund e Absorvância (Adaptado de Montenegro *et al.*, 2005).

| Cor do mel | mm PFund | Absorvância |
|-------------------|-------------|---------------|
| Branco Água | 0-8 | 0,104-0,125 |
| Extra Branco | 8-16,5 | 0,125-0,148 |
| Branco | 16,5-34 | 0,148-0,195 |
| Âmbar Extra Claro | 34-50 | 0,195-0,238 |
| Âmbar Claro | 50-85 | 0,238-0,333 |
| Âmbar | 85-114 | 0,333-0,411 |
| Escuro | Mais de 114 | 0,411 ou mais |

ANEXO B

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE
SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE MEL POR CHARM II

Charm II Sulfa Drug Test for Honey

Operator's Manual

NOTE CHANGE:

- New Determination of Control Point
The control point has been changed to -25% from a known negative honey average to increase the sensitivity slightly.

Charm Sciences, Inc.
659 Andover Street,
Lawrence, Massachusetts
01843-1032, USA

Tel: 1.978.687.9200
Fax: 1.978.687.9216
Email: info@charm.com
www.charm.com



Copyright 2003 Charm Sciences, Inc. All rights reserved. All trademarks are property of their respective owners.

Honey Sulfa 08.DOC

Feb 05

Table of Contents

I. INTRODUCTION: CHARM II TEST 3

I.A OVERVIEW 3

I.B PRINCIPLES 3

I.C HANDLING EXEMPT QUANTITIES OF RADIOACTIVE MATERIALS 5

I.D SCINTILLATION FLUID AND TEST TUBES 5

II. CHARM II SULFA DRUG TEST IN HONEY 6

II.A TABLET REAGENTS 6

II.B PREPARATION AND STORAGE OF STANDARDS AND BUFFERS 7

II.C INSTRUCTIONS FOR ASSAY PERFORMANCE MONITORING: 8

II.D HONEY EXTRACT PREPARATION 8

II.E SULFA DRUG COMPETITIVE ASSAY 11

II.F DETERMINATION OF CONTROL POINT 12

II.G DETERMINATION OF POSITIVE 12

II.H PERFORMANCE MONITORING 12

I. Introduction: Charm II Test

I.A Overview

The Charm II Sulfa Drug Test for Honey is a microbial receptor assay for the detection of sulfa drugs. This test detects sulfamethazine (sulfadimidine) at 10 ppb (parts per billion) and many other sulfa drugs including sulfathiazole at approximately 5 - 20 ppb in honey. The extraction procedure is required to free sulfa drugs bound to sugars in honey and to eliminate interference from sulfa drug analogs such as para-aminobenzoic acid (PABA).

Order Codes

SMIHH-500 (500 tests)

SMIHH-100 (100 tests)

Includes SULFA tablet reagents, Zero Control Standards, Multi-Antimicrobial Concentrate Standards, 20cc syringes, 50 ml conical tubes, Bond Eluate C18 Varian columns, bivalves, glass filters, filter holders, and Varian adapters.

I.B Principles

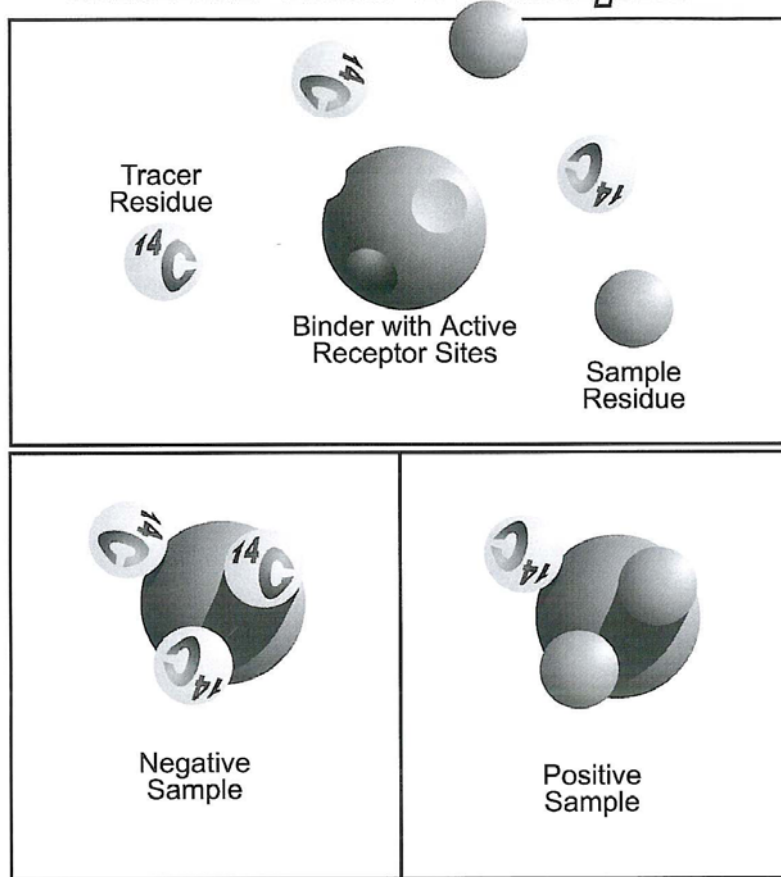
For the detection of sulfa drugs, two reagents are required: a [³H] labeled sulfamethazine and a binding reagent (microbial cell containing receptors for the antimicrobial drugs). When the binding reagent is added to a sample with sulfa drugs, the contaminating sulfa drugs bind to receptors in the cell. This prevents the [³H] sulfamethazine from binding to these sites.

Therefore, **the more [³H] labeled sulfamethazine bound, the less sulfa drug there is in the sample** (see Figure 1).

The amount of [³H] bound to the cells is measured with a Charm II Test analyzer in counts per minute (cpm). The lower the cpm, the higher the amount of contamination in the sample.

Figure 1: Charm Test Principle

Charm Test Principle



^{14}C shown. ^3H is used in the sulfa test.

I.C Handling Exempt Quantities of Radioactive Materials

The contents of the [³H] sulfamethazine supplied with the Charm Test are sufficiently low that they are exempt from Nuclear Regulatory Commission and Agreement State Regulations. Observe the following precautions when handling radioactive materials:

1. There should be no pipetting by mouth.
2. There should be no smoking, eating or use of cosmetics while radioactive materials are being handled. Ingestion is the greatest health threat during this time.
3. Wash hands thoroughly after handling radioactive materials.
4. Wipe up spills immediately and thoroughly.
5. Solid waste contaminated with [¹⁴C] or [³H] may be put into the normal trash after removing or blacking out all radioactive labels.
6. Liquid waste contaminated with [¹⁴C] or [³H] may be put into the sanitary sink drains and flushed with copious amounts of water.

I.D Scintillation Fluid and Test Tubes

Handling

The scintillation fluid to be used with your Charm II Test kit is Opti-fluor[®]. Please note the Material Safety Data Sheet provided with the fluid. Dispose of waste or used scintillation fluid by flushing down a sink drain followed by at least 25 times the volume of water.

Shelf Life

The shelf life of an open container of Opti-fluor is 6 months. The shelf life of an unopened container of Opti-fluor stored at ambient temperature is two years.

Test Tubes

Borosilicate glass test tubes are required for proper analyzer function. Soda ash test tubes and flint glass test tubes will cause erroneous [3H] channel readings and improper timing of the analyzer.

II. Charm II Sulfa Drug Test in Honey

II.A Tablet Reagents

Tablet reagents are packaged in blister packs. Lot number and expiration date (a minimum of 6 months at -15 °C or below from packaging date) are embossed on the blister pack.

Store blister packs at -15 °C or below. Blister packs can be kept at room temperature (15-25 °C) for up to 6 hours.

Table 1 lists identification letter, type and color of each tablet in each blister pack.

| Drug Family | Identification Letter on Plastic Face of Blister Pack | Binding Reagent Tablet Color | [³ H] Sulfamethazine Tablet Color [§] |
|-------------|---|------------------------------|--|
| Sulfa Drugs | Sm | white | pink |

§ Each [³H] pink tablet contains less than 3.0 kBq [³H]. Refer to section I.C. The radioactive material [³H] in this kit is sufficiently low to be exempt from licensing.

Radioactive Material -- Not For Human Use - Introduction into foods, beverages, cosmetics, drugs or medicinals, or into products manufactured for commercial distribution, is prohibited -- Exempt quantities should not be combined.

II.B Preparation and Storage of Standards and Buffers

1. **Zero Control Standard** — Store dry standard at 0-4.4 °C. Zero Control Standard milk powder is included in the kit. When reconstituted, it is comparable to milk from cows certified to be antimicrobial drug free. Reconstitute with 100 ml of 40 °C water as indicated on label. Shake well (until all clumps are broken up). Cool on ice to 0-4.4 °C before use.
2. **MSU Multi-Antimicrobial Concentrate Standard**
Store dry standard at 2-6 °C. Reconstitute as directed on label. Shake well. Allow to stand refrigerated or on ice for 15 minutes before use. While in use, standard may be held on ice or at 2-6 °C for up to 48 hours. Frozen reconstituted standard may be stored for up to 2 months at -15 °C or below. Hold thawed standard on ice at 2-6 °C for up to 24 hours.

Instructions for Honey Fortification:

Follow section II.C. Honey Extract Preparation for spiking procedure. Refer to table 2 for concentration in honey.

Table 2: Concentration (ppb) of Sulfamethazine

| | | Honey Fortification | | Performance Monitoring |
|--------------------|---|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Antimicrobial Drug | MSU Multi-antimicrobial Concentrate Standard Reconstituted with 10 ml | Conc. in Honey (sections II.D.) | Approximate Conc. in Assay | Approximate Conc. in Assay |
| Sulfamethazine | 1000 | 10 | 5 | 5 |

3. **1M HCl**
To prepare 1 liter of fresh 1M HCl from concentrate: measure approximately 917 ml of deionized or distilled water and add slowly while stirring 83 ml of concentrated HCl (12.1 N).
4. **30% NaOH**
Dissolve 30 g of NaOH in deionized or distilled water and bring up to 100 ml.
5. **0.3% NaOH**
Dilute 1.0 ml 30% NaOH with 99.0 ml deionized or distilled water.

II.C Instructions for Assay Performance Monitoring:

To be used for checking reagents and equipment along with presumptive positive samples.

- 1. Negative Control**
Known negative (sulfa drug free) honey; honey tested within $\pm 15\%$ of Zero Control Standard average.
- 2. Positive Control**
Positive control honey; Negative Control spiked at 10 ppb sulfamethazine. To spike honey at 10 ppb sulfamethazine add 0.05 ml (50 μ l) of MSU Multi-antimicrobial Concentrate Standard to 5.0 g of known negative honey (honey tested within $\pm 15\%$ of Zero Control Standard average) and follow procedure described in II.D.2.

II.D Honey Extract Preparation

1. General Information

- A. Run extracts on same day they are prepared. Run a Negative Control (known negative honey, honey tested within $\pm 15\%$ of Zero Control Standard average) and a Positive Control (Negative Control spiked at 10 ppb sulfamethazine).
- B. Use fresh honey. Do not use honey with excess bacterial contamination.
- C. If sugar crystallization has occurred, heat gently in warm water until sample is clear and homogeneous.
- D. Use methanol under a fume hood. Dispose of waste according to regulations.

2. Hydrolysis:

- A. Weigh out **5.0 g of honey** in a 50 ml conical tube.
- B. **Add 20.0 ml of 1M HCl**. Mix well until honey is completely dissolved.
- C. **Incubate at room temperature for 1 hour.**
- D. **Using a pH meter, carefully pH balance to 7.7 - 8.0:**
 - A.1. While mixing, slowly add 2.0 ml 30% NaOH and mix well. pH should be 1.0-5.0.
 - A.2. Then carefully drop by drop add 0.3% NaOH until pH is 7.7-8.0. **Allow enough time for pH meter to equilibrate once pH is reached. Cap and reshake tube very well and take pH again. Adjust as necessary.** Take care not to exceed 8.0. If pH is greater than 8.0, carefully adjust to 7.7-8.0 with 0.1 M HCl.

-
3. Filter assembly
 - A. Open filter holder.
 - B. Take upper part and place it upside down. Insert white gasket.
 - C. Take one glass fiber filter and place it on top of the white gasket, adding one or two drops of water to the filter helps to keep it in place.
 - D. Place bottom into filter holder and tighten.
 - E. Turn assembled filter right side up.

 4. Syringe assembly (see diagram 1):
 - A. Attach bivalve to syringe.
 - B. Attach filter holder to bivalve.

 5. Varian Cartridge assembly (see diagram 2):

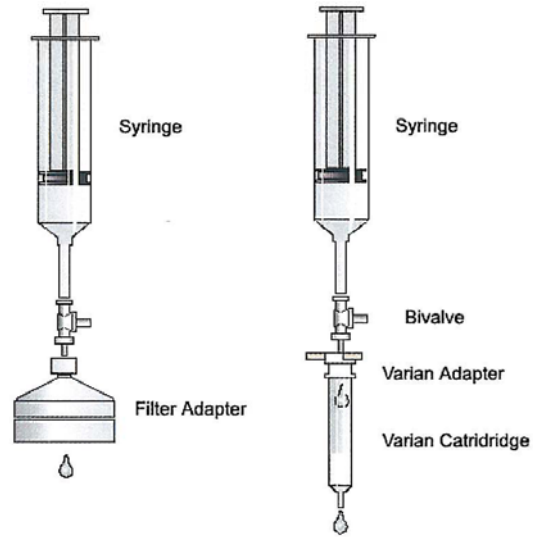
Attach C18 Varian cartridge to Varian adapter.

 6. Filtering the sample
 - A. Using the syringe assembly, filter the sample through glass fiber filter.
 - B. **Collect** the entire sample in a beaker or clean container.
 - C. After sample has been push through, detach filter holder.
Rinse syringe and bivalve with 10 ml of deionized water.

 7. C18 Varian Cartridge Pretreatment
 - A. Attach Varian Cartridge assembly to bivalve in syringe assembly.
 - B. Activate Varian C18 cartridge by pushing through 5.0 ml of methanol (cartridge should be used within 10 minutes of activation).
 - C. Wash cartridge with 5.0 ml of water. Repeat.

 8. C18 Extraction Procedure
 - A. Add filtered sample from step II.D.7. to the syringe and push sample extract through preactivated C18 Varian cartridge slowly one drop at a time. Discard liquid that flows through the cartridge.
 - B. Wash with 5 ml of distilled water and discard flow through.
 - C. Remove Varian C18 cartridge from assembly and directly add 1.0 ml of methanol into the cartridge. Attach Varian C18 cartridge to the assembly.
 - D. Push methanol slowly one drop at a time through cartridge and collect the eluate in a 13 x 100 test tube.
 - E. Dry eluate for each sample under nitrogen or use airpump (such as aquarium pump) in 40-45°C incubator block.

-
- F. Once the methanol is completely evaporated add 5.0 ml of Zero Control Standard and mix very well. Let it sit on ice 10 minutes before running the assay.
- G. Wash syringe, plunger, bivalve and filter adapter with water. Paper towel or air dry before re-use. Discontinue use of syringe and plunger when plunger produces significant back pressure.



DO NOT RE-USE VARIAN CARTRIDGES

Diagram 1

II.E Sulfa Drug Competitive Assay

Run Charm II test for: Sample eluates, Positive Control eluate and Negative Control eluate in Zero Control Standard.

1. Using the blunt end of a pen or pencil, **push white tablet** through blister pack into an empty test tube.
2. Using the water pipette, **add $300 \pm 100 \mu\text{l}$ of water** to the tablet. Mix with test tube mixer for 10 seconds to break up tablet.
3. Using Finn pipette, **add 5.0 ml Zero Control Standard containing Sample dried eluate, Positive Control dried eluate and Negative Control dried eluate (from step II.D.9.F.)** into test tube (use new tip for each sample).
4. Using the blunt end of a pen or pencil, **push pink tablet** (marked Sm ->) through blister pack into test tube.
5. **Mix** with test tube mixer for about 15 seconds, causing sample to rise and fall 15 times. Note: The tablet uses a timed release dissolution and will not dissolve completely. Do not over mix.
6. **Place in incubator at $85 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 minutes.**
7. **Centrifuge for 3 minutes** (setting 7 on IEC Clinical or 3.3 x 1000 rpm on IEC Centra CL-2 or 33 x 100 rpm on Hettich Rotofix 32 or 3400 rpm on the Heraeus Centrifuge). Immediately remove from centrifuge and pour off milk. Keep test tube inverted.
8. Remove fat ring and wipe test tube dry with swabs. Do not disturb pellet.
9. **Add $300 \pm 100 \mu\text{l}$ of water** and break up pellet by mixing well.
10. **Add $3.0 \pm 0.5 \text{ ml}$ scintillation fluid** to the test tube, cap and mix.
11. **Count test tube** in analyzer for 60 seconds. Read cpm (count per minute) on [3H] channel of analyzer.
12. Negative Control should test greater than the control point and Positive Control should test less than the control point.
13. **Compare count with control point** (section II.F.) to determine positive or negative. If results are less than or equal to the control point, sample is considered positive. If results are greater than the control point, sample is considered negative. If sample tests positive, **repeat test with a negative control and a positive control** to validate positive results (section II.G.).

II.F Determination of Control Point

The control point is the cutoff number between a negative and "retest for positive" result. Test results greater than the control point indicate a negative sample, while results less than or equal to the control point indicate the sample is presumptive positive and needs to be retested. The control point determination uses a Negative Control, known negative honey sample to set test sensitivity. Establish a new control point for each new lot of reagents. This control point is valid for the life of the kit.

1. Run six (6) Negative Controls, known negative honey samples (tested within $\pm 15\%$ of Zero Control Standard average) following the extraction and assay procedure.
2. Average cpm results.
3. Subtract 25% from the average. This is the control point.
4. If sample result is greater than the control point, sample is negative.
5. If sample result is less than or equal to the control point, sample is presumptive positive and needs to be retested with Negative Control and Positive Control (see section II.G.).

II.G Determination of Positive

1. **Repeat test with sample, Negative Control and Positive Control** (section II.C).
2. **If sample still counts less than or equal to the control point and the control test results are in the expected range** (section II.H.), **the sample is positive** (containing greater than or equal to 10 ppb sulfamethazine or equivalent).

II.H Performance Monitoring

Establish a Zero Control Standard average for each new lot of reagents by running three Zero Control Standard samples and averaging the results. Daily and when testing presumptive positives, test a Negative Control and Positive Control to verify that reagents and equipment are working properly.

1. The Negative Control should test $\pm 20\%$ of the Zero Control Standard average.
2. The Positive Control should test less than the control point.
3. If these conditions are not met, redetermine averages and control point and retest sample. Seek technical assistance by contacting your local Charm representative or Charm Sciences at 978-687-9200.

ANEXO C

SULFONAMIDAS DETECTADAS PELO TESTE CHARM II E LIMITES DE DETECÇÃO

Na Tabela C.1. apresentam-se as sulfonamidas detectadas no mel pelo teste CHARM II e os limites de detecção para cada sulfonamida.

Tabela C.1. – Sulfonamidas detectadas no mel pelo teste CHARM II e limites de detecção (adaptado de <http://www.charm.com>).

| Sulfonamida | Limite de detecção (ppb) |
|-----------------------|---------------------------------|
| sulfametazina | 10 |
| sulfadimetoxina | 5 |
| sulfamerazina | 20 |
| sulfatiazol | 10 |
| sulfadiazina | 30 |
| sulfacetamida | 50 |
| sulfacloropiridazina | 5 |
| sulfadoxina | 10 |
| sulfametoxipiridazina | 10 |
| sulfapiridazina | 10 |
| sulfaquinoxazol | 4 |
| sulfisoxazol | 20 |
| sulfametoxazol | 15 |
| sulfametizol | 20 |
| sulfameter | 10 |
| sulfapiridina | 15 |
| dapsona | 3-4 |