

# Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência

Janete Alaburda<sup>(1)</sup>, Valter Ruvieri<sup>(1)</sup>, Luzia Shundo<sup>(1)</sup>, Adriana Palma de Almeida<sup>(1)</sup>, Paulo Tiglea<sup>(1)</sup> e Myrna Sabino<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av. Dr. Arnaldo, nº 355, Cerqueira César, CEP 01246-902 São Paulo, SP. E-mail: jalaburd@ial.sp.gov.br, vruvieri@ial.sp.gov.br, lushundo@ial.sp.gov.br, apalma@ial.sp.gov.br, patiglea@ial.sp.gov.br, mysabino@ial.sp.gov.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar e validar um método para determinação de resíduos de sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ) e sulfadimetoxina (SDM) em leite UHT integral. A extração foi realizada com diclorometano e coluna de extração em fase sólida de sílica. Os resíduos, após derivação com fluorescamina, foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. O limite de detecção das três sulfas em amostra de leite integral foi  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e o limite de quantificação foi  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  para STZ e SMZ e  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para SDM, com coeficientes de variação entre 4,4 e 6,6%. Os valores de recuperação para STZ, SMZ e SDM foram 63,2, 91,2 e 63,2%, respectivamente. Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a soma das concentrações totais de STZ, SMZ e SDM, o método descrito permite a determinação simultânea dos três analitos em amostras de leite UHT integral.

Termos para indexação: fluorescamina, sulfonamida, sulfametazina, sulfadimetoxina.

## Sulfonamides in milk by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection

**Abstract** – The objective of this work was to evaluate and validate a method for analysis of sulfathiazole (STZ), sulfamethazine (SMZ) and sulfadimethoxine (SDM) residues in milk. Extraction was carried out with dichloromethane followed by silica solid phase extraction. The extracts were derivatized with fluorescamine and quantified by reversed-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The detection limit for the three sulfonamides was  $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$  and the quantification limit was  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  for STZ and SMZ and  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  for SDM, with coefficient of variation ranging from 4.4 to 6.6%. The recoveries for STZ, SMZ and SDM were 63.2, 91.2 and 63.2%, respectively. Considering that Brazilian regulation sets maximum residue limit in milk of  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  for total sulfonamide concentrations (STZ, SMZ and SDM), the present method is adequate to quantify the residues of three sulfonamides simultaneously in UHT milk.

Index terms: fluorescamine, sulphonamides, sulfamethazine, sulfadimethoxine.

### Introdução

As sulfonamidas são fármacos sintéticos utilizados extensivamente para tratamento de infecções bacterianas, causadas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos (Pastor-Navarro et al., 2007). Estes compostos são derivados do *p*-aminobenzenosulfonamida, caracterizados por um grupo arila contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para*. Vários parâmetros físico-químicos têm sido correlacionados com a atividade quimioterápica das sulfonamidas, tais como, pKa, ligação com proteínas e distribuição da carga eletrônica (Martinez et al., 2003).

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), que impedem a sua utilização pelas bactérias, na síntese do ácido fólico. Os microrganismos sensíveis são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico. O efeito bacteriostático induzido pelas sulfonamidas é anulado competitivamente pelo PABA. As células de mamíferos não são afetadas, uma vez que necessitam de ácido fólico pré-formado por serem incapazes de sintetizá-lo (Gilman et al., 2003).

Os resíduos de sulfonamidas podem ser encontrados em alimentos de origem animal, tais como mel, leite, ovos, peixes e carnes (Adesiyun et al., 2006). A maioria das

sulfas apresenta meia-vida relativamente longa, ocasionando sérios problemas para a saúde humana, entre os quais reações alérgicas ou tóxicas (Sversson, 2006). Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se ainda que aproximadamente 5% dos pacientes humanos que são tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais (Montanaro, 1998). Por sua vez, o amplo uso de medicamentos veterinários pode ser responsável pelo aparecimento de cepas de bactérias resistentes. O limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pela Comunidade Européia para o total de sulfonamidas em músculo, fígado, rim e leite é de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (European Community, 1990).

As sulfonamidas, bem como outros medicamentos, têm sido administradas ao gado leiteiro, e resíduos dessas substâncias podem ser encontrados no leite. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu um LMR de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , como medida preventiva de saúde pública. Este limite refere-se à soma das concentrações totais de sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ) e sulfadimetoxina (SDM) (Anvisa, 2003).

O isolamento e a concentração dos resíduos de sulfas em matrizes diversas são normalmente obtidos por extração líquido-líquido, seguida ou não por extração em fase sólida. A separação e a quantificação dos resíduos, por sua vez, são usualmente conduzidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Diversos detectores têm sido estudados, tais como arranjo de diodos (Hela et al., 2003; Garcia et al., 2004), ultravioleta (Pecorelli et al., 2004), fluorescência (Maudens et al., 2004; Salisbury et al., 2004) e de massas (Dost et al., 2000; Msagati & Nindi, 2004). Na detecção por fluorescência, é necessária a derivação dos analitos. Apesar dos trabalhos publicados, não existe um método validado para a análise simultânea de resíduos de STZ, SMZ e SDM na matriz leite.

Em recente revisão sobre métodos para determinação de sulfonamidas em matrizes biológicas, Wang et al. (2006) concluem que os métodos analíticos envolvem várias etapas de extração e limpeza, o que os torna demorados, e, portanto, não seriam adequados para análises de triagem. Ainda, entre os trabalhos publicados, parte relata baixas recuperações, porém os métodos são adequados para a confirmação e quantificação desses quimioterápicos (Wang et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar e validar um método analítico para a quantificação simultânea de STZ, SMZ e SDM em leite UHT integral, por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando derivação pré-coluna

com fluorescamina e detecção por fluorescência (CLAE-FI).

## Material e Métodos

Todos os solventes e reagentes utilizados foram grau analítico, exceto ácido acético, metanol e acetonitrila que foram grau CLAE, adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany) e fluorescamina da Aldrich (Steinheim, Germany). Os padrões de sulfas utilizados foram sal de sódio de sulfatiazol (Fluka, pureza  $\geq 99\%$ ), sulfametazina (Sigma, pureza  $\geq 99\%$ ) e sulfadimetoxina (Sigma, pureza  $\geq 99\%$ ). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água milliQ (Millipore) ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ). As colunas de extração em fase sólida de sílica-gel foram adquiridas da Applied Separations (Spe-ed Cartridges, Silica Gel, 500 mg por 6 mL, Applied Separations, Allentown, PA) e as unidades filtrantes não estéril de membrana HV com poros de  $0,45 \mu\text{m}$  e diâmetro de 13 mm da Millipore. A solução estoque padrão de sulfas foi preparada em metanol e as soluções de trabalho foram preparadas em solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), pH 4.

Inicialmente, foram testados diferentes valores de pH do meio reacional, vários reagentes para precipitação das proteínas e diversas composições de solventes orgânicos para a extração dos resíduos de sulfonamidas. Amostras de leite UHT integral fortificadas com concentrações de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , para cada uma das sulfonamidas estudadas, foram extraídas com clorofórmio, diclorometano, mistura de clorofórmio ou diclorometano com diferentes solventes, como acetona, acetato de etila e éter de petróleo. Solução aquosa de ácido tricloroacético e soluções tampão 0,1 M de fosfato de potássio (pH 7) ou 0,1 M de acetato de sódio (pH 4) também foram utilizados antes da extração com solventes. Dois tratamentos diferentes e independentes para os extratos foram utilizados, a evaporação do solvente e a eluição por EFS-Si. Os melhores resultados foram obtidos com a mistura de extração composta por diclorometano:éter de petróleo (100:3, v/v) e EFS-Si, segundo o procedimento a seguir.

Um volume de 5 mL de amostra de leite UHT integral homogeneizado e à temperatura ambiente foi transferido para um funil de separação e extraído com três porções de 30 mL de solução de diclorometano:éter de petróleo (100:3, v/v). Aos extratos reunidos foram adicionados 10 mL de éter de petróleo e a solução resultante foi purificada através de coluna de extração em fase sólida de sílica-gel (EFS-Si) e eluída sob gravidade. Depois

que todo o líquido foi transferido para a EFS-Si, o erlenmeyer que continha os extratos foi lavado com um pouco do eluato, o qual foi novamente transferido para a EFS-Si. O excesso de líquido da EFS-Si foi eliminado por pressão e o mesmo foi secado sob fluxo de nitrogênio ( $N_2$ ) durante 5 min. As sulfonamidas foram eluídas com 10 mL de metanol, sob gravidade, e o eluato foi recolhido em um frasco âmbar e evaporado sob atmosfera de  $N_2$  até a secura, com aquecimento inferior a  $40^\circ C$ . O extrato secado foi ressuscitado em 0,9 mL de solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), pH 4, e derivado com 0,1 mL de solução de fluorescamina a 0,1% em acetona (m/v), por 20 min a  $40^\circ C$ . Como os derivados obtidos da reação de sulfonamidas com fluorescamina são instáveis (Salisbury et al., 2004), imediatamente a mistura resultante foi quantificada por CLAE-FL, após ser filtrada em unidade filtrante de membrana HV.

Na separação e detecção das sulfonamidas, foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (GBC, Dandenong, Victoria, Austrália) equipado com bomba isocrática (LC 1110), detector de fluorescência (LC 1255) e coluna analítica LiChrosorb C18 (Merck, Darmstadt, Germany), 25 cm x 4 mm, 5  $\mu m$  e pré-coluna Phenomenex C18, 4x3 mm, 5  $\mu m$ . Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solução aquosa de ácido acético a 4% (v/v) e de acetonitrila (55:45, v/v) a uma vazão de 1 mL  $min^{-1}$ . O comprimento de onda de excitação foi de 404 nm e de emissão 494 nm.

A determinação das concentrações dos analitos nas amostras fortificadas foi realizada por padronização externa. Diariamente, visando checar os parâmetros cromatográficos e a linearidade de resposta do detector, foi injetada uma solução contendo os derivados fluorescentes das três sulfas antes do início das análises. A injeção da amostra, previamente derivada, foi realizada em válvula e loop de 20  $\mu L$  e em quintuplicata.

Definidas as melhores condições de extração, derivação, separação e quantificação, o método foi validado quanto à seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação.

Quanto ao estudo de seletividade, oito amostras de leite UHT integral de diferentes marcas e dentro do período de validade fornecido pelo fabricante foram avaliadas. Estas amostras foram extraídas e derivadas segundo o procedimento descrito anteriormente. A partir dos cromatogramas obtidos por CLAE-FL, a seletividade foi verificada pelo não-aparecimento de outros picos na região referente aos tempos de retenção de cada uma das sulfas quantificadas.

A linearidade foi avaliada a partir da construção da curva de calibração obtida pelo gráfico da concentração do analito em função da área do pico cromatográfico. Foram preparadas de forma independente sete soluções-padrão contendo as três sulfas (STZ, SMZ e SDM) com as seguintes concentrações individuais: 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 57  $\mu g L^{-1}$  em solução aquosa de ácido acético a 1% (pH 4). Cada solução-padrão foi derivada com fluorescamina e quantificada por CLAE-FL em triplicatas independentes, injetando-se um volume de 20  $\mu L$ . Para verificar se os pontos encontravam-se dentro da região linear da curva foi realizada a análise de resíduos, adotando-se confiança de 95%.

A exatidão e precisão do método foram avaliadas a partir de amostras fortificadas com quantidade conhecida de solução-padrão contendo as três sulfonamidas (STZ, SMZ e SDM). As amostras de leite UHT integral, previamente analisadas por CLAE-FL e isentas de sulfas, foram fortificadas no laboratório nas concentrações de 0,3, 1, 2,5, 5 e 10  $\mu g L^{-1}$  para cada uma das sulfas estudadas. As amostras fortificadas foram extraídas e derivadas segundo procedimento descrito, antes da quantificação por CLAE-FL. A recuperação foi determinada por comparação das concentrações dos analitos adicionados com as obtidas pela quantificação em quintuplicata de amostras fortificadas independentemente.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram definidos a partir dos resultados de recuperação e dos respectivos coeficientes de variação. Para o LQ, utilizou-se como parâmetro de aceitação a menor concentração medida com valores de recuperação e coeficiente de variação que atendessem os critérios de desempenho para métodos de análises para resíduos de drogas veterinárias em alimentos (Codex, 2003), ao passo que, para o LD, utilizou-se como parâmetro de aceitação a menor concentração detectada e altura do pico cromatográfico superior a três vezes a do ruído da amostra em branco no mesmo tempo de retenção.

A análise de variância (ANOVA) da regressão linear, com o uso do programa Excel 2000, foi utilizada para avaliar as curvas de calibração de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina.

## Resultados e Discussão

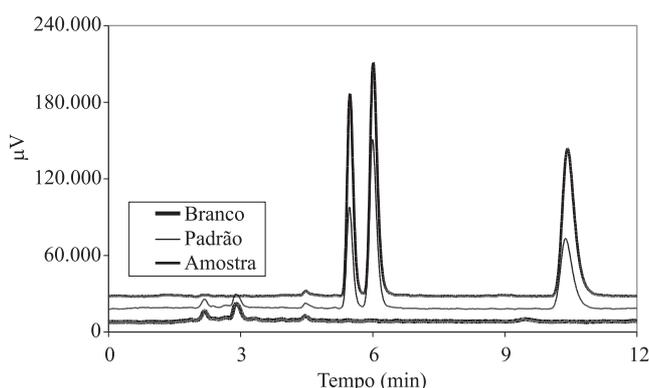
Para as três sulfas, os coeficientes angulares apresentaram alta significância estatística ( $p < 0,001$ ) e, por sua vez, os coeficientes lineares não apresentaram

significância estatística ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1). Ou seja, as três curvas são lineares e passam pela origem (0,0). Desta forma, o método apresentou linearidade na faixa de concentrações de 1 a 57  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A partir da análise de resíduos dos valores de concentração e áreas de picos cromatográficos, não foram observados “outliers” (Figura 1).

O método apresentou seletividade, uma vez que os extratos derivados de amostras de diferentes marcas de leite UHT integral ( $n = 8$ ) não apresentaram picos

**Tabela 1.** Tempo de retenção (TR) e análise de variância da regressão linear para a curva analítica de sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ) e sulfadimetoxina (SDM).

Sulfas	TR (min)	Área = a[Sulfas] + b		Valor p		r
		a	b	a	b	
STZ	5,2±0,3	25.306,2	9.255,1	<0,001	0,205	0,9992
SMZ	5,8±0,3	33.711,0	5.133,5	<0,001	0,604	0,9991
SDM	9,7±0,3	37.766,1	9.974,1	<0,001	0,978	0,9992



**Figura 1.** Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna com fluorescamina e detecção por fluorescência referentes à análise de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina em amostras de leite UHT integral, sem contaminação (branco) e fortificada a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e de solução padrão a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

interferentes no tempo de retenção dos analitos estudados, segundo cromatogramas para STZ, SMZ e SDM obtidos após a reação de derivação com fluorescamina (Figura 1).

Tradicionalmente a extração de sulfonamidas a partir de matrizes biológicas tem sido feita com solventes orgânicos (Wang et al., 2006). Como elas são mais solúveis em solventes polares, usa-se normalmente clorofórmio, diclorometano, acetona, acetonitrila ou acetato de etila. Alguns desses solventes orgânicos promovem a desnaturação e precipitação das proteínas, auxiliando na extração, porém, algumas vezes, utilizam-se reagentes específicos para esse processo.

As sulfonamidas são iônicas por natureza e suas solubilidades variam amplamente em função da polaridade do solvente e do pH do meio reacional, fatores que afetam de forma significativa as porcentagens de recuperação (Wang et al., 2006). Neste trabalho, observou-se que, quando se realizava a extração só com diclorometano, ocorria a formação de emulsão diminuindo as porcentagens de recuperação. A introdução de pequeno volume de éter de petróleo com o diclorometano foi fundamental para evitar a formação de emulsão.

Os valores de recuperação e os respectivos coeficientes de variação de amostras de leite UHT integral fortificadas no laboratório nas concentrações de 0,3, 1, 2,5, 5 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 2) atendem aos critérios de desempenho para métodos de análise para resíduos de drogas veterinárias em alimentos (Codex, 2003). A partir desses resultados, definiram-se os seguintes limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD): para STZ e SMZ de 1 e 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, e para SDM de 2,5 e 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esses valores de LD e LQ são inferiores aos obtidos por Agarwal (1992) e Wang et al. (2006). Papapanagiotou et al. (2005) obtiveram valor de LQ igual a 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para SMZ em leite, enquanto Soto-Chinchilla et al. (2005) obtiveram valores de LD e LQ,

**Tabela 2.** Recuperação de sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ) e sulfadimetoxina (SDM) de amostras fortificadas independentes ( $n = 5$ ) de leite integral pasteurizado, extraídas com uma mistura de diclorometano e éter de petróleo (100:3, v/v) e submetidas à derivatização com fluorescamina.

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	STZ		SMZ		SDM	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
0,3	57,8	39,1	85,6	41,9	96,1	25,9
1,0	62,7	4,4	88,7	5,4	52,9	6,6
2,5	68,7	7,4	93,2	3,8	66,1	6,3
5,0	60,1	8,1	92,1	17,3	62,6	13,1
10,0	61,3	6,2	90,7	3,1	61,0	8,2

respectivamente, de 7,1 e 19,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para SMZ e de 9,5 e 26  $\mu\text{g L}^{-1}$  para SDM em amostras de leite.

Os valores de recuperação para STZ, SMZ e SDM encontrados (63,2, 91,2 e 63,2%, respectivamente) foram iguais ou muitas vezes superiores aos relatados em procedimentos anteriores. Pecorelli et al. (2005) quantificaram dez resíduos de sulfonamidas em amostras de músculo e obtiveram valores de recuperação e seus respectivos coeficientes de variação para STZ, SMZ e SDM de 62,4% (CV = 6,22%), 81,2% (CV = 6,44%) e 75,2% (CV = 5,72%), respectivamente, para a concentração de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Papapanagiotou et al. (2005) verificaram que a porcentagem de recuperação e o coeficiente de variação para SMZ em amostras de leite foram de 76,34 e 9,42%, respectivamente, com limite de quantificação de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Maudens et al. (2004), analisando sulfonamidas em amostras de mel por CLAE com derivação pós-coluna, verificaram que os valores de recuperação ficaram entre 37 e 67% com limites de quantificação na faixa de 2 a 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

A análise de 10 sulfas em carne e fígado por CLAE com derivação pré-coluna resultou em recuperações na faixa de 64 a 75% para concentrações de 1 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Stoef & Michailova, 2000). Na determinação de sete sulfas em amostras de leite por CLAE, com derivação pré-coluna com fluorescamina e detecção por quimioluminescência após derivação pós-coluna, foram obtidos limites de detecção e quantificação para SMZ de 7,1 e 19,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para SDM de 9,5 e 26  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, com valores de recuperação na faixa de 67 a 86% para SMZ e de 56 a 72% para SDM (Soto-Chinchilla et al., 2005). Feltrin et al. (2007) obtiveram uma recuperação de 76% (CV = 24%) para sulfadimetoxina em leite em concentrações de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , usando extração em fase sólida (C 8).

Os métodos analíticos por CLAE para resíduos de sulfonamidas têm sido extensivamente revisados (Soto-Chinchilla et al., 2005). Alguns métodos multirresíduos têm sido publicados, porém poucos trabalhos descrevem método para análise simultânea de STZ, SMZ e SDM em amostras de leite (Wang et al., 2006). Um desses métodos utiliza CLAE com detector de massas (LD na faixa de 16,8–24,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e outros dois utilizam CLAE com detector de UV-visível ou arranjo de diodos, os quais não citam valores de LD e LQ.

O método descrito neste trabalho permite a análise simultânea dos três analitos em amostras de leite UHT integral disponíveis para o consumo humano. As condições experimentais da etapa de derivação com fluorescamina

foram avaliadas e otimizadas, e os trabalhos não citam claramente a padronização de todos os parâmetros que podem influenciar a velocidade dessa reação.

## Conclusões

1. A utilização de partição líquido-líquido com diclorometano e éter-etílico e extração em fase sólida de sílica permitem a extração simultânea de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina em amostras de leite UHT integral.

2. A quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência, usando fase reversa e reação de derivação pré-coluna com fluorescamina, é adequada para a separação e determinação de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina nos extratos de amostras de leite UHT integral.

3. O método proposto apresenta limites de detecção e quantificação adequados para monitoramento desses analitos em amostras de leite.

## Referências

- ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; LASHLEY, V.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; GEORGES, K. Prevalence of antimicrobial residues in table eggs in Trinidad. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1501-1505, 2006.
- AGARWAL, V.K. High performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. **Journal of Chromatography**, v.624, p.411-423, 1992.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo**. PAMVet, 5., 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2007.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex Committee on residues of veterinary drugs in foods. **Review of performance based criteria for methods of analysis for veterinary drug residues in foods**. 14<sup>th</sup>. Washington: Codex Alimentarius Commission, 2003.
- DOST, K.; JONES, D.C.; DAVIDSON, G. Determination of sulfonamides by packed column supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometric detection. **Analyst**, v.125, p.1243-1247, 2000.
- EUROPEAN COMMUNITY. Establishment of maximum residue levels of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin, Council Regulation n. 2377/90. **Official Journal of European Community**, L224/1, 1990.
- FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M.S.; SANTOS, J.G.R.; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTOURA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.30, p.80-82, 2007.

- GARCIA, I.; SARABIA, L.; ORTIZ, M.C.; ALDAMA, J.M. Robustness of the extraction step when parallel factor analysis (PARAFAC) is used to quantify sulfonamides in kidney by high performance liquid chromatography diode array detection (HPLC DAD). *Analyst*, v.129, p.766-771, 2004.
- GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.E. *As bases farmacológicas da terapêutica*. São Paulo: Mcgraw Hill Interamericana do Brasil, 2003. 10.ed. 1671p.
- HELA, W.; BRANDTNER, M.; WIDEK, R.; SCHUH, R. Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC DAD for detection. *Food Chemistry*, v.83, p.601-608, 2003.
- MARTINEZ, F.; AVILA, C.M.; GOMEZ, A. Thermodynamic study of the solubility of some sulfonamides in cyclohexane. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.14, p.803-808, 2003.
- MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high performance liquid chromatography with post column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v.1047, p.85-92, 2004.
- MONTANARO, A. Sulphonamide allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v.18, p.843-850, 1998.
- MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*, v.64, p.87-100, 2004.
- PAPAPANAGIOTOU, E.P.; FLETOURIS, D.J.; PSOMAS, E.I. Effect of various heat treatments and cold storage on sulphamethazine residues stability in incurred piglet muscle and cow milk samples. *Analytica Chimica Acta*, v.529, p.305-309, 2005.
- PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGO-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. *Talanta*, v.71, p.923-933, 2007.
- PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; GALARINI, R. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union Regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, v.1032, p.23-29, 2004.
- PECORELLI, I.; BIBI, R.; FIORONI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Sulfonamides residues analysis: evaluation of results dispersion at maximum residual limit by the expanded uncertainty and 2002/657/EC decision limit approaches. *Analytica Chimica Acta*, v.529, p.15-20, 2005.
- SALISBURY, C.D.C.; SWEET, J.C.; MUNRO, R. Determination of sulfonamide residues in the tissues of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, v.87, p.1264-1268, 2004.
- SOTO-CHINCHILLA, J.J.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M.; IMAI, K.; GARCÍA-AYUSO, L.E. High performance liquid chromatographic post column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxy carbonyl)phenyl]oxalate as chemiluminescent reagent. *Journal of Chromatography A*, v.1095, p.60-67, 2005.
- STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v.871, p.37-42, 2000.
- SVENSSON, C. Drug hypersensitivity: where do we stand. *AAPS Journal*, v.8, p.E236-E238, 2006.
- WANG, S.; ZHANG, H.Y.; WANG, L.; DUAN, Z.J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. *Food Additives and Contaminants*, v.23, p.362-384, 2006.

---

Recebido em 18 de abril de 2007 e aprovado em 11 de outubro de 2007