

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de um Método para Quantificação Simultânea
de Sulfametoxazol e Trimetoprima em Ovos de Galinha utilizando
a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Bidimensional**

Fernando Campos Costa Rodrigues de Paula*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Química, área de
concentração Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Quezia B. Cass

*** Bolsista CNPq**

São Carlos – SP
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P324dm

Paula, Fernando Campos Costa Rodrigues de.
Desenvolvimento de um método para qualificação
simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em ovos de
galinha utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência
bidimensional / Fernando Campos Costa Rodrigues de
Paula. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
115 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2007.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Colunas
RAM. 3. Cromatografia multidimensional. 4. Sulfametoxazol.
5. Ovos. 6. Trimetoprima. I. Título.

CDD: 574.0894 (20^a)

*“Pedras no caminho?
Sim, guardo todas, pois um dia ainda construirei um castelo”*

Fernando Pessoa

*Dedico esta Dissertação aos meus maravilhosos pais, **Laercio e AnaMaria**, que compartilharam meus objetivos e os alimentam, incentivando-me a prosseguir, independente dos obstáculos.*

*A minha maravilhosa irmã, **Luciana**, que me ilumina com sua bondade, inteligência e paz.*

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Quezia B. Cass**, por sua orientação e dedicação. Obrigado pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, o que com certeza me proporcionou uma excelente formação profissional.

A **todo corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR

A **todos os professores** do Departamento de Química da UFSCar.

Aos meus amigos do grupo de Síntese Orgânica e CLAE: **Angela Cavallini De Pietro, Airton Vicente Pereira, Bianca Rebelo Lopes, Carmen Lúcia Cardoso, Fernando Gonçalves de Almeida, Flávio Luis Beltrame, Juliana Barrero, Kátia Roberta Anacleto Belaz, Kenia Lourenço Vanzolini, Lúcia Regina Rocha Martins, Marcela Cristina Moraes, Mariana Coimbra, Maria Luiza Cruzera Montanari, Mirian Cristina Couvre, Patrícia Polachini, Regina Vincenzi de Oliveira, Tiago de Campos Lourenço, Túlio Ferreira Galatti, Vanessa Migliorinni Urban e Virgínia Verônica de Lima.** Agradeço todos pela amizade, incentivo, colaboração e momentos descontraídos durante todos esses anos de convívio.

Ao **Rui**, pela atenção e ajuda na redação deste trabalho.

Ao **Alexandre Augusto Cruz**, por sua infinita disponibilidade de ajudar com os equipamentos e pela amizade, conselhos e caronas para Atibaia.

A **Bianca Rebelo Lopes** e ao **Joel Alvim Júnior**, por seus ensinamentos em síntese orgânica e pelo incentivo, amizade e carinho.

Ao **Fernando Gonçalves de Almeida**, por sua disposição em ajudar no desenvolvimento do trabalho, contribuindo com inúmeras caronas e empréstimo do seu carro e pelas conversas descontraídas.

Ao **Luiz Fernando Arruda Santos**, pela sua amizade, conselhos e brincadeiras.

Aos meus queridos amigos da turma de Química 2001-UFSCar e da República: **Antonio Rodrigues Junior, Caio Tombi Canineo, Marcelo Soares**

Fávero, Rafael Erlo, Ricardo Luis Tranquilin, por todos os momentos descontraídos, apoio e alegria que foram muito importantes para conseguir continuar seguindo em frente.

À **Profa. Dra. Regina Vincenzi de Oliveira**, pela sua disposição em me ajudar, pela sua amizade e incentivo.

A **Angela Cavallini De Pietro**, por sua disposição de sempre me ajudar com o desenvolvimento deste trabalho, pelo seus ensinamentos em cromatografia e também pelo seu carinho, paciência, alegria e simpatia que contagia a mim e a todos do laboratório. Obrigado por me deixar fazer parte da sua vida.

Aos meus maravilhosos pais, **Laercio e AnaMaria**, por toda a dedicação, apoio, amor e carinho do qual me fortalece para encarar todos os obstáculos da vida.

A minha maravilhosa irmã, **Luciana**, pela sua dedicação, apoio, amor, carinho e paz que mesmo estando longe sempre está preocupada comigo, me aconselhando e iluminado os meus pensamentos.

Ao **CNPq**, pela bolsa fornecida.

A todos que puderam contribuir para que este trabalho fosse realizado.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS:

λ	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
ADS	Alquil-Diol-Sílica (<i>Alkyl-Diol-Silica</i>)
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C ₁₈	Octadecil-Sílica
C ₈	Octil-Sílica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coefficiente de Variação
C ₁₈ -BSA	Fase RAM tipo octadecil-Sílica BSA-Imobilizada
C ₈ -BSA	Fase RAM tipo octil-Sílica BSA-Imobilizada
CBB	Corante <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
d.i.	Diâmetro Interno
DMFS	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
EFSC	Extração com Fluido Supercrítico
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
FDA	Food and Drug Administration
Fenil-BSA	Fase RAM tipo fenil-Sílica BSA-Imobilizada
HSA	Albumina Sérica Humana (<i>Human Serum Albumin</i>)
IRSP	Fase de Superfície Interna Reversa (<i>Internal Surface Reversed-Phase</i>)
ISO	Isopropanol
LPS	Fases com Grandes Partículas (<i>Large Particules Support</i>)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MFP	Fase de Função Mista (<i>Mixed-Function Phase</i>)
MIP	Polímero de Reconhecimento Molecular (<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PP	Precipitação de Proteínas
pI	Ponto Isoelétrico
pH	Ponto Hidrogeniônico
r	Coefficiente de Correlação
RAM	Fases de Acesso Restrito (<i>Restricted-Access Media</i>)
RAM-BSA	Fase RAM BSA-Imobilizada

SHP	Fase Hidrofóbica Blindada (<i>Shielded Hydrophobic Phase</i>)
SMX	Sulfametoxazol
SPS	Fase Semipermeável (<i>Semi-Permeable Surface</i>)
TBA	Tetrabutilamônio
TFA	Ácido trifluoroacético
TMP	Trimetoprima
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1. 1 - Composição do Ovo de galinha ⁵	12
--	----

Resultados e Discussão

Tabela 4. 1 - Características físico-químicas das fases estacionárias utilizadas para a preparação das colunas RAM-BSA.....	46
Tabela 4. 2 – Percentagem de exclusão protéica de amostras de ovo utilizando colunas RAM-BSA na primeira fração coletada (5,0 mL).	51
Tabela 4. 3 - Condições cromatográficas utilizadas para a análise de SMX/TMP em amostras de ovos, com o acoplamento das colunas C ₁₈ -BSA (10 x 0,46 cm d.i) e C ₁₈ -Luna (15 x 0,46 cm d.i).	88
Tabela 4. 4 - Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia para a análise de SMX em amostras de ovo de galinha.....	93
Tabela 4. 5 - Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia para a análise de TMP em amostras de ovo de galinha.....	93
Tabela 4. 6 - Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia para análise em amostras de ovo fortificado com SMX (A) e TMP (B).	95
Tabela 4. 7 - Eficiência de extração obtida para as amostras de CQ do sulfametoxazol e trimetoprima (n=5).....	96
Tabela 4. 8 - Precisão e exatidão obtidas no teste cego de SMX/TMP em amostras de ovo (n=3).	97
Tabela 4. 9 - Resultados do estudo de estabilidade do SMX em amostras de ovo, nos ciclos de gelo e degelo.....	99
Tabela 4. 10 - Resultados do estudo de estabilidade da TMP em amostras de ovo, nos ciclos de gelo e degelo.....	99
Tabela 4. 11 - Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de ovo, fortificadas com SMX, armazenadas a -20°C.	100

Tabela 4. 12 - Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de ovo fortificadas com TMP, armazenadas a -20°C.....	101
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. 1 - Consumo per capita de ovos em alguns países.	3
Figura 1. 2 - Estrutura molecular básica das sulfonamidas.	5
Figura 1. 3 - Decomposição do vermelho prontossil no corpo humano.	5
Figura 1. 4 - Estrutura química das sulfonamidas e seus derivados.	6
Figura 1. 5 - Estrutura química da trimetoprima.	7
Figura 1. 6 - Similaridade estrutural do ácido p-aminobenzóico e da sulfanilamida.	8
Figura 1. 7 – Comportamento ácido/base das sulfonamidas.	8
Figura 1. 8 - Síntese bacteriana do ácido fólico; A e B são locais de ação das sulfonamidas e trimetoprima, respectivamente.	9
Figura 1. 9 - Esquema do mecanismo de exclusão das macromoléculas pelo suporte de LPS. ²⁷	18
Figura 1. 10 - Desenho esquemático dos princípios fundamentais das colunas RAM. ³⁰	19
Figura 1. 11 - Sílica porosa recoberta por ligantes combinados. ²⁷	20
Figura 1. 12 - Fases SHP. ²⁷	20
Figura 1. 13 - Fases MFP. ²⁷	21
Figura 1. 14 - Internal Surface Reversed Phase (ISRP) com grupos GFF e alquil-diol-sílica (ADS) com cadeias alquílicas. ²⁷	22
Figura 1. 15 - SPS e suportes de sílica recobertos com proteínas. ²⁷	23
Figura 4. 1 - Esquema de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das bases de shiff entre a BSA e o glutaraldeído; (2) redução das bases de Shiff e dos grupos aldeídos residuais.	47
Figura 4. 2 - Estrutura do corante Coomassie Brilliant Blue (CBB)	48
Figura 4. 3 - Procedimento realizado para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas do ovo pelas colunas RAM-BSA. ⁶⁸	49

- Figura 4. 4** - Espectros obtidos da reação do corante CBB com as amostras do ovo, eluídas da coluna extratora C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i) (100 Å, 10µm). (—) corante CBB com água; (—) CBB complexado com 100µL amostra referência de ovo; (—) CBB complexado com a primeira fração (0-5 min) de 100µL de ovo, eluída da coluna extratora. 50
- Figura 4. 5** - Comparação entre os espectros obtidos da segunda fração (5-10 min) de 100µL de amostras de ovo, eluída pela coluna extratora C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i) (100 Å, 10µm) (—) e do corante CBB com de água (—). 50
- Figura 4. 6** - Cromatogramas dos perfis de exclusão das proteínas do ovo nas colunas RAM-BSA (10 x 0,46cm d.i).Condições Cromatográficas: Fase Móvel: 0-20 min água; 20-25 min ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); vazão: 1,0mL/min; volume de injeção:100µL e $\lambda = 280$ nm 53
- Figura 4. 7** - Cromatogramas dos perfis de exclusão das proteínas do ovo na coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46cm d.i) em diferentes pHs. A) KH₂PO₄ 0,01M pH=2,5; B) KH₂PO₄ 0,01M pH=6,5; vazão de 1,0mL/min e $\lambda = 280$ nm..... 54
- Figura 4. 8** - Cromatograma do perfil de exclusão protéica do ovo de galinha na coluna C18-BSA, utilizando 100% de água como eluente à uma vazão de 1mL/min. Volume de injeção 300µL e $\lambda = 280$ nm..... 55
- Figura 4. 9** - Diagrama esquemático do sistema utilizado para determinar as condições cromatográficas de exclusão das macromoléculas e extração dos antibióticos. 57
- Figura 4. 10** - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10µg/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₈-BSA. Condições cromatográficas: fase móvel A – KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (5: 95 v/v) 0-5 min; fase móvel B - KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (17: 83 v/v) 5-20 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50µL; $\lambda = 265$ nm..... 57
- Figura 4. 11** - Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o acoplamento das colunas RAM-BSA e analítica. Posição 1 – colunas não acopladas; Posição 2 – colunas acopladas (transferência dos analitos)..... 58

Figura 4. 12 - Cromatograma obtido da análise do SMX/TMP (10µg/mL) preparados em solução metanólica, com acoplamento das colunas C₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i) Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) solução KH₂PO₄ 0,01 M pH 6,0: ACN (95:5 v/v) 5 min; (b) KH₂PO₄ 0,01 M pH 6,0:ACN (83:17 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH₂PO₄ 0,01 M pH 5,0:ACN (82:18 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (8-13 min), volume 50µL e λ=265 nm..... 59

Figura 4. 13 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10µg/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA. Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (83:17 v/v); volume de injeção de 50µL; vazão 1,0mL/min e λ=265 nm..... 60

Figura 4. 14 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10µg/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA. Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 50µL; vazão 1,0mL/min e λ=265 nm..... 61

Figura 4. 15 - Cromatograma obtido da análise da amostra de SMX/TMP, preparada em solução metanólica (10µg/mL), com acoplamento da coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈-Luna (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (95:5 v/v) 5 min; (b) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (8-11,5 min), volume 50µL e λ= 265 nm. 62

Figura 4. 16 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10µg/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA (5 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5

v/v) e 5-20 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μL ; vazão 1,0mL/min e $\lambda=269$ nm. 64

Figura 4. 17 - Cromatograma obtido da análise da amostra de SMX/TMP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), preparada em solução metanólica, com acoplamento da coluna C_{18} -BSA (5 x 0,46 cm d.i.) e C_8 (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) solução KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (95:5 v/v) 5 min; (b) KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (7.9-10,2 min), volume de injeção 25 μL e $\lambda = 269\text{nm}$ 65

Figura 4. 18 - Cromatogramas ilustrando a perda da precisão dos tempos de retenção, ao longo do dia, na coluna RAM C_{18} -BSA (5 x 0,46cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5 v/v) e 5-20 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em MeOH); vazão 1,0mL/min e $\lambda=269$ nm. 66

Figura 4 19 - Cromatograma ilustrando a perda da precisão dos tempos de retenção, ao longo do dia, na coluna RAM C_{18} -BSA (5 x 0,46cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0) e 5-20 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0): ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em MeOH); $\lambda=269$ nm e vazão 1,0mL/min. 67

Figura 4. 20 - Cromatogramas representativos das análises de amostras de SMX/TMP(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), preparadas em solução metanólica, na coluna RAM C_{18} -BSA (5 x 0,46 cm d.i), em diferentes temperaturas. Condições cromatográficas: 0-5 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (98:02 v/v) e 5-20 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μL ; $\lambda=269$ nm; vazão 1,0mL/min; (—) primeira injeção e (—) terceira injeção. 68

Figura 4. 21 - Cromatograma ilustrando a etapa de extração de SMX/TMP de amostras de ovo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pela coluna RAM C_{18} -BSA (5 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0); 5-20 min:

KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 25 μ L; $\lambda=269$ nm; temperatura 35°C e vazão 1,0 mL/min. 69

Figura 4. 22 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10 μ g/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (98:02 v/v) e 5-20 min: KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μ L; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0 mL/min. 71

Figura 4. 23 - Cromatograma demonstrando a separação dos antibióticos em amostra preparada em metanol (10 μ g/mL), com acoplamento da coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) KH_2PO_4 0,01 M pH 6,0:ACN (98:02 v/v); (b) KH_2PO_4 0,01 M pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH_2PO_4 0,01 M pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (10,6-12,2 min), volume 25 μ L e λ 269nm. 72

Figura 4. 24 - Cromatograma ilustrando a extração de SXM/TMP de amostras fortificadas de ovo (10 μ g/mL) pela coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 0,01 M pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 150 μ L; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0mL/min. 73

Figura 4. 25 - Cromatograma da análise de amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (10 μ g/mL), com acoplamento das colunas C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); (b) KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (9,4-12,0 min), volume 150 μ L e λ 269nm. 74

Figura 4. 26 - Cromatogramas ilustrando as extrações de amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 µg/mL) pela coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i), em dias diferentes. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25min: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 150µL; λ=269nm e vazão 1,0 mL/min..... 75

Figura 4. 27 - Cromatograma ilustrando a extração de amostra de ovo fortificada com SMX/TMP (6 µg/mL) pela coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução NH₄Ac 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de NH₄Ac 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); 20-25 min: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 150 µL; λ=269 nm e vazão 1,0 mL/min..... 76

Figura 4. 28 - Cromatograma ilustrando a análise de amostra de ovo fortificada com SMX/TMP (6 µg/mL), com acoplamento das colunas C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) 0-5 min NH₄Ac 0,01 M pH 6,0:ACN (98:02 v/v) 5 min; (b) 5-20 min NH₄Ac 0,01 M pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) NH₄Ac 0,01 M pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (10,0-13,0 min), volume 25µL e λ 269nm. 77

Figura 4. 29 - Cromatogramas das extrações de SMX/TMP, em amostras preparadas em solução metanólica (6 µg/mL) (A) e em amostras preparadas em ovo (6 µg/mL) (B) pela coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH₂PO₄ 0,01 M pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25 min: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 150µL; λ=269nm e vazão 1,0 mL/min..... 78

Figura 4. 30 - Cromatogramas das replicatas (n = 3) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 µg/mL) na coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i) utilizando como agente de precipitação: (A) (NH₄)₂SO₄ (4 mol/L) e

(B) ACN. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25min: ACN: H_2O :ISO (65:20:15 v/v/v); volume de injeção de 150 μL ; $\lambda=269\text{nm}$ e vazão 1,0 mL/min..... 80

Figura 4. 31 - Cromatogramas das replicatas (n = 3) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na coluna RAM C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i), utilizando o agente de precipitação de proteínas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4,0 mol/L) no pré-tratamento das amostras. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25min: ACN: H_2O (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μL ; temperatura 35°C; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0 mL/min. 81

Figura 4. 32 - Cromatogramas das replicatas (n = 3) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na coluna RAM C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i), utilizando agente de precipitação de proteínas ACN para o preparo das amostras. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25min: ACN: H_2O (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μL ; temperatura 35°C; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0 mL/min. 82

Figura 4. 33 - Cromatogramas das replicatas (n = 2) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), na coluna RAM C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução de TFA 5 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 5 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 5 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μL ; temperatura 35°C; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0 mL/min. 84

Figura 4. 34 - Cromatogramas das replicatas (n = 2) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), na coluna RAM C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução de TFA 10 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 10 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de

TFA 10 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μ L; temperatura 35°C; vazão 1,0 mL/min.; $\lambda=240$ e 269 nm. 85

Figura 4 35 - Cromatograma demonstrando a separação dos antibióticos em amostra preparada com ovo (6 μ g/mL), com acoplamento das colunas C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) 0-5 min solução de TFA 10 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 10 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 10 mmol/L:ACN (30:70 v/v) e Bomba 2: (d) TFA 10 mmol/L:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (10,0-15,0 min), volume de injeção 150 μ L; $\lambda=240$ e 269 nm. 86

Figura 4. 36 - Cromatogramas de amostras de ovo não fortificada (A) e fortificada com SMX/TMP (6 μ g/mL) (B), na coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: solução de TFA 50 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 50 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μ L; temperatura 35°C; vazão 1,0 mL/min.; $\lambda=240$ e 269 nm. 87

Figura 4. 37 - Cromatogramas da análise de amostra fortificada de ovo (1 μ g/mL TMP e 2 μ g/mL SMX), com acoplamento das colunas C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₁₈-Luna (15 x 0,46 cm d.i). A - $\lambda = 240$ nm e B - $\lambda = 269$ nm. . 88

Figura 4. 38 - Curvas de calibração do SMX e da TMP. 90

Figura 4. 39 - Cromatogramas ilustrando o desgaste da coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm), após sucessivas injeções de ovo. 92

Figura 4 40 - Cromatograma ilustrando a extração de SMX/TMP de amostra fortificada de ovo (6 μ g/mL), na coluna nova RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: solução de TFA 50 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 50 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μ L; temperatura 35°C; vazão 1,0 mL/min.; $\lambda=240$ e 269 nm; 94

Figura 4. 41 - Curvas de calibração obtidas para o SMX e TMP em amostras de ovo, na nova coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). 95

Figura 4. 42 - Cromatograma demonstrando uma análise da amostra CQ baixo, com acoplamento das colunas C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₁₈ (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) 0-5 min solução de TFA 50 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 10 mmol/L:ACN (30:70 v/v) e Bomba 2: (d) TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (10,3-14,0 min), volume de injeção 250µL; temperatura 35°C e λ=240 nm.....**Erro!**
Indicador não definido.

Figura 4. 43 - Curvas de calibração obtidas para o SMX e TMP em amostras de ovo, na coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). 98

RESUMO

“Desenvolvimento de um Método para Quantificação Simultânea de Sulfametoxazol e Trimetoprima em Ovos de Galinhas utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Bidimensional”.

Neste trabalho foi preparada e avaliada uma série de colunas de acesso restrito (RAM) de albumina sérica bovina (BSA) para a desproteínização on-line de amostras de ovo. As três colunas preparadas (C₈, C₁₈ e fenil) mostraram elevada percentagem de exclusão de proteínas do ovo, usando somente água como eluente. No entanto, foi observado aumento da pressão no sistema cromatográfico, a cada injeção, o que tornou inviável a injeção direta das amostras de ovo, nas condições inicialmente avaliadas. Para prolongar a vida útil das colunas RAM-BSA foi necessário a utilização de um agente de precipitação de proteínas, e dentre os agentes avaliados, acetonitrila mostrou-se o solvente mais eficiente, permitindo a injeção repetitiva de volumes de 300µL de amostras de ovo, sem alteração da pressão no sistema cromatográfico. Para o desenvolvimento do método de análise simultânea dos antibióticos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) em ovos, no modo multidimensional, foram também avaliadas colunas RAM-BSA de diferentes comprimentos (10 e 5 cm) e em diferentes condições cromatográficas. O sistema, composto por uma coluna RAM C₁₈-BSA, acoplada a uma coluna analítica C₁₈, permitiu o desenvolvimento do método com excelente precisão, exatidão e com adequada sensibilidade. Os limites de quantificação foram de 80 ng/mL, para ambos compostos. Desta forma, o método desenvolvido poderá ser utilizado para o monitoramento de resíduos destes antibióticos em amostras de ovo.

ABSTRACT

“Development of a Method for Simultaneous Quantification of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Hens Eggs using Bidimensional High Performance Liquid Chromatography”.

This work reports the investigation of a series of bovine serum albumin (BSA) restricted access media columns (RAM) for on-line egg samples deproteinization. High exclusion percentage of egg's proteins were obtained with the three RAM BSA columns prepared (C₈, C₁₈ and phenyl) using only water as eluent. However, an increase of pressure of the chromatographic system was observed at each injection, which made unfeasible the use of these columns for direct injection of the egg samples. To prolong the life-time of the RAM-BSA columns, acetonitrile was used as a protein precipitate agent. This clean-up procedure allowed the repetitive injection of 300 µL of whole egg samples. For the simultaneous quantification of sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) in eggs samples, RAM-BSA columns, in different lengths (10 and 5 cm) sizes and different chromatographic conditions were thoroughly evaluated. A bidimensional higher performance liquid chromatography configuration having a RAM C₁₈ BSA column in the first dimension, and a C₁₈ analytical column in the second dimension were used for simultaneous quantification of these antibiotics. The developed method showed good selectivity, accuracy and precision with limits of quantification 80 ng/mL for both compounds. Thus, the validated method is reliable and sensitive for monitoring residues in whole eggs samples.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
1.1 Ovos: importância econômica e nutricional	2
1.2 Sulfametoxazol	4
1.3 Trimetoprima	7
1.4 Mecanismo de ação dos antibióticos	7
1.5 Matriz biológica: ovo.....	10
1.6 Análise de fármacos em ovos	12
1.7 Determinação de sulfonamidas e trimetoprima em ovos de galinha.....	26
2. Objetivos.....	30
3. Procedimento Experimental.....	32
3.1 Generalidades.....	32
3.2 Preparo das colunas RAM-BSA	34
3.2.1 Sílicas utilizadas	34
3.2.2 Empacotamento das colunas	34
3.2.3 Imobilização da BSA nas fases hidrofóbicas	34
3.3 Avaliação das colunas RAM-BSA quanto ao poder de exclusão das proteínas do ovo de galinha – Método de Bradford	35
3.3.1 Preparo do reagente de Bradford ⁵⁹	35
3.3.2 Obtenção das amostras excluídas das colunas RAM-BSA e preparo das amostras de referência.....	35
3.3.3. Medidas espectrofotométricas das amostras coletadas e de referência	36
3.4 Desenvolvimento do método analítico	37
3.4.1 Preparo das soluções padrão do sulfametoxazol e da trimetoprima ...	37
3.4.2 Preparo das amostras de calibração e controle de qualidade	38
3.4.3 Obtenção das curvas analíticas.....	38

3.5 Parâmetros analíticos para validação de fármacos em matrizes biológicas	40
3.5.1 Seletividade	40
3.5.2 Eficiência de extração (recuperação) e transferência dos analitos.....	40
3.5.3 Precisão e exatidão	40
3.5.4 Limite da quantificação (LQ) e detecção (LD).....	41
3.5.5 Estudos de estabilidade	41
3.5.5.1 Estabilidade de longa duração	42
3.5.5.2 Estabilidades durante ciclos de degelo	42
3.5.5.3 Estabilidade de curta duração	42
3.5.5.4 Estabilidades das amostras durante a permanência no auto-injetor	43
3.5.5.6 Estabilidade da matriz biológica.....	43
4. Resultados e Discussões	45
4.1 Preparo das colunas RAM-BSA	45
4.1.1 Determinação da capacidade de exclusão das proteínas do ovo pelas colunas RAM-BSA.....	47
4.2 Otimização das condições cromatográficas para utilização das colunas RAM-BSA, no modo multidimensional, na análise dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima.	56
4.3 Avaliação das colunas RAM-BSA de 5 cm de comprimento no desenvolvimento do método	62
4.4 Reavaliação das colunas RAM-BSA de 10 cm de comprimento	70
4.5 Avaliação de agentes precipitantes no preparo das amostras.....	79
4.6 Avaliação de agentes de pareamento iônico no controle da ionização dos antibióticos SMX e TMP em amostras de ovo	83
4.7 Validação do método analítico	89
4.7.1 Estabilidade das amostras.....	97
4.7.1.1 Estabilidade em ciclos de gelo e degelo	98

4.7.1.2 Estabilidade de longa duração	100
4.7.1.3 Estabilidade de curta duração	101
4.7.1.4 Estabilidade em solução.....	102
5. Conclusões.....	104
6. Referências Bibliográficas.....	107

Introdução

"Todo mundo tem dentro de si um fragmento de boas notícias. A boa notícia é que você não sabe quão extraordinário você pode ser! O quanto você pode amar! O que você pode executar! E qual é o seu potencial!"

Anne Frank

1. Introdução

1.1 Ovos: importância econômica e nutricional

O ovo é o produto daquela que se considera ser a mais eficiente máquina biológica de transformação, a galinha de postura. Esta ave consegue transformar recursos alimentares, de menor valor biológico, em um produto da mais alta qualidade nutricional para o consumo humano. Todo este processo depende de fatores biológicos relacionados à composição fisiológica deste tipo de aves, assim como do seu suporte nutricional, somado ao manejo e ambiente adequados à criação das mesmas.^{1,2}

O ovo apresenta a maior quantidade de nutrientes essenciais à alimentação humana, em relação ao seu conteúdo calórico, quando comparado com qualquer outro alimento. É importante destacar que, apesar do alto valor nutricional e do baixo valor comercial, o consumo de ovos no Brasil é maior nas classes com rendas média e alta.²

A produção de ovos comerciais para o consumo cresceu consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo; porém, no Brasil, este crescimento não foi relevante, devido ao baixo consumo “per capita” de ovos (138 unidades/ano), quando comparado a outros países como, Japão, Taiwan, México, China e EUA, onde o consumo varia de 258 a 346 unidades per capita (Figura 1.1).³

Mesmo assim, a avicultura de postura brasileira ocupa o sétimo lugar no ranking mundial, quanto ao volume de produção de ovos. Este setor movimenta anualmente, no Brasil, US\$ 2 bilhões, com a produção de cerca de 22,2 bilhões de unidades de ovo por ano, referente a 2,1% da produção mundial total.³

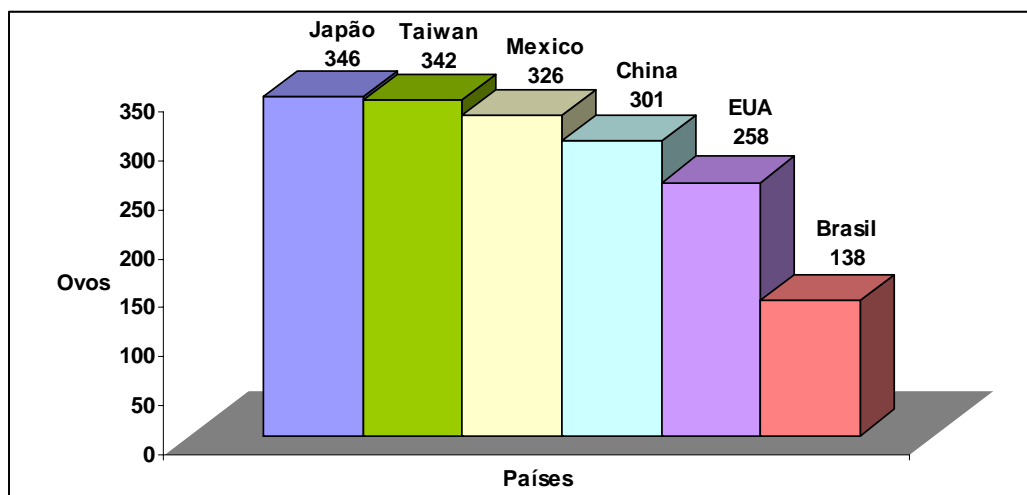


Figura 1. 1 - Consumo per capita de ovos em alguns países.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE-2005) apresentou, através da pesquisa trimestral relacionada a este produto, que os principais Estados produtores de ovos são: São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.⁴

No entanto, com a crescente prática de uma avicultura “selvagem”, que visa apenas o lucro e não o bem estar dos animais, surgiram condições propícias para o desenvolvimento e proliferação de enfermidades, principalmente as causadas por bactérias.⁵ Desta forma, para evitar a proliferação de doenças, é fundamental a conscientização dos produtores sobre a importância das boas práticas de manejo, cuidado e higiene com os animais. Essas práticas, no entanto, não são cautelosamente realizadas, e o tratamento e/ou prevenção de doenças passa a ser realizado com a administração massiva de antibióticos, que são utilizados como aditivos na água ou na ração.^{5,6}

São utilizados diferentes tipos de antibióticos para esta finalidade e dentre as principais classes utilizadas podem-se destacar as penicilinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e sulfonamidas.⁶

O não cumprimento do tempo de carência entre a administração do medicamento e a coleta do ovo, a falta de informação dos produtores e a não fiscalização dos órgãos de controle, implicam na presença de resíduos de

antibióticos nos ovos que, na maioria das vezes, causam danos à saúde pública e também danos de ordem econômica.

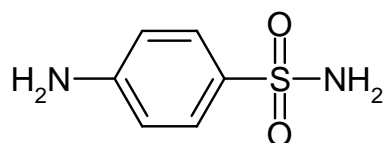
No Brasil, os antibióticos para uso veterinário são vendidos livremente em lojas de produtos agropecuários e podem ser usados pelos criadores sem prescrição e orientação médica veterinária, embora exista decreto-lei tornando obrigatória a venda de antibióticos somente mediante receita.⁷

Dentre os antibióticos e quimioterápicos mais utilizados na avicultura, o uso da combinação do sulfametoxazol-trimetoprima (SMX-TMP) é de grande preocupação, uma vez que os resíduos destes podem causar problemas como, distúrbios urinários, reações alérgicas em indivíduos sensíveis, alterações na microflora intestinal e a possibilidade de transferência de bactérias resistentes, de origem animal, como a *Salmonella*.^{7,8} Além disso, as sulfonamidas são apontadas como compostos com potencial carcinogênico.⁹

As diretrizes internacionais de controle de resíduos em alimentos, como a FDA (Food and Drug Administration) e a União Européia, estabelecem normas severas para o controle de resíduos de antibióticos em alimentos.^{10,11} A utilização da trimetoprima e sulfametoxazol em aves produtoras de ovos para o consumo humano é proibida. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a detecção e a quantificação de resíduos destes antibióticos em ovos destinados ao consumo humano.

1.2 Sulfametoxazol

O sulfametoxazol pertence à classe de quimioterápicos denominados sulfonamidas, ou simplesmente sulfas, sendo a sua estrutura molecular básica o p-aminobenzenossulfonamida (sulfanilamida) (Figura 1.2).



Sulfanilamida

Figura 1. 2 - Estrutura molecular básica das sulfonamidas.

Apesar da síntese das sulfonamidas ter sido realizada em 1908, por Gelmo, só em 1932 Domagk descobriu a atividade antibactericida das sulfonamidas, contra estreptococos, utilizando o vermelho protosil em camudongos.¹²

Posteriormente, em 1936, descobriu-se que a sulfanilamida era a porção ativa da molécula de prontosil. Este composto sofre um processo de bioativação metabólica, por ação de azo-redutases, produzindo, “in vivo”, a sulfanilamida, responsável pela pronunciada ação antibacteriana (Figura 1.3).

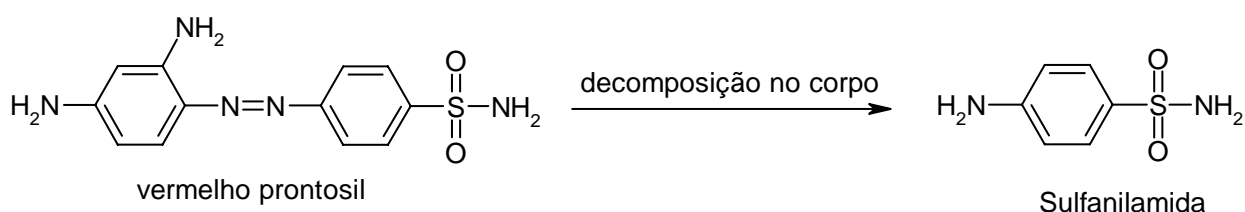


Figura 1. 3 - Decomposição do vermelho prontosil no corpo humano.

Esta descoberta estimulou intensas pesquisas para o desenvolvimento de novas sulfonamidas e muitas foram sintetizadas no final dos anos 30.^{12, 13} Os melhores resultados terapêuticos de novas sulfonamidas foram obtidos com compostos, onde um hidrogênio do grupo sulfonamida (-SO₂NH₂) era substituído por algum outro grupo, geralmente um anel heterocíclico (Figura 1.4). Devido à importância do grupo sulfonamida na sua atividade, o nitrogênio foi convencionalmente denominado N¹, e o nitrogênio do grupo amino foi designado de N⁴.¹⁴

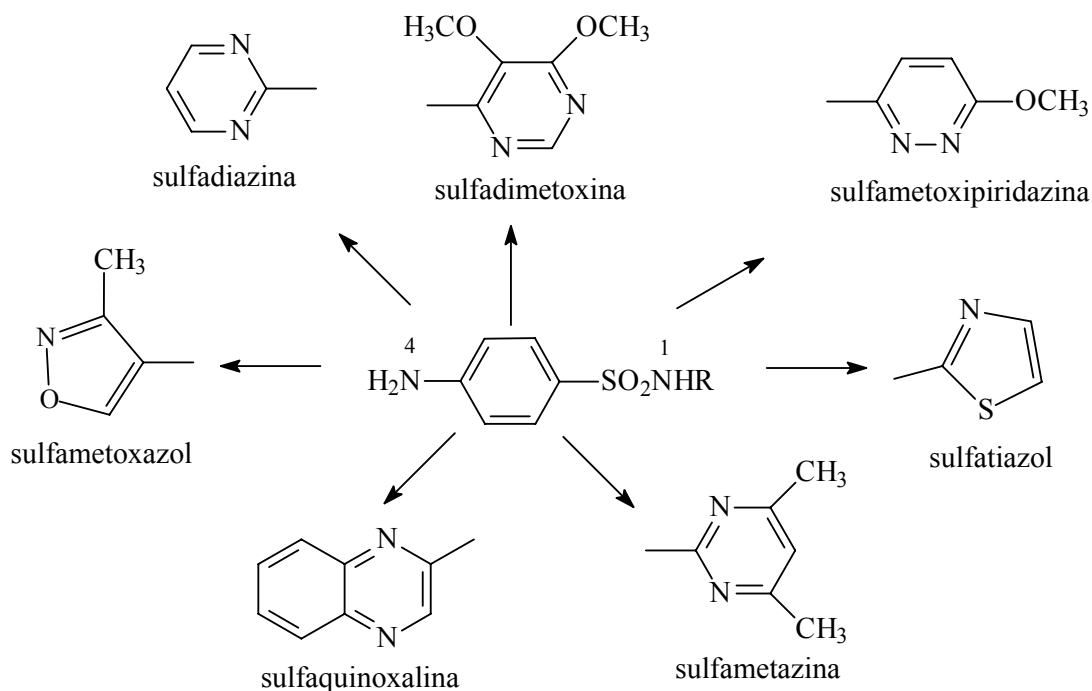


Figura 1. 4 - Estrutura química das sulfonamidas e seus derivados.

As sulfonamidas foram os primeiros agentes antibacterianos a serem utilizados na clínica médica.¹⁵ Durante os anos 40 foram consideradas como substâncias milagrosas para o tratamento de infecções em seres humanos e em animais.

Em seres humanos, as sulfonamidas foram utilizadas com resultados extraordinários contra pneumonia, gangrena gasosa, infecções das vias urinárias e contra o estreptococo que causava a febre puerperal. Entretanto, com o surgimento de bactérias resistentes, a presença de vários efeitos colaterais e a disponibilidade de outros antibióticos, como as penicilinas, as sulfonamidas passaram a ocupar menor destaque entre os agentes antibacterianos.¹⁴ Atualmente, existem cerca de 5000 sulfonamidas e destas somente 33 foram introduzidas na terapêutica humana e/ou animal.¹⁴

1.3 Trimetoprima

A partir da década de 70, as sulfonamidas passaram a ser utilizadas em combinação com a trimetoprima (Figura 1.5), um derivado diaminobenzilpirimidínico que atua em sinergia com as sulfonamidas, ampliando o espectro bacteriano. Esta combinação atua eficientemente contra bactérias que adquiriram resistência para as sulfonamidas.^{14, 16}

A associação sulfametoxazol-trimetoprima tem muitas aplicações terapêuticas em aves, no tratamento de doenças respiratórias, diarreia e coriza infecciosa, salmonelose, entre outras.¹⁴

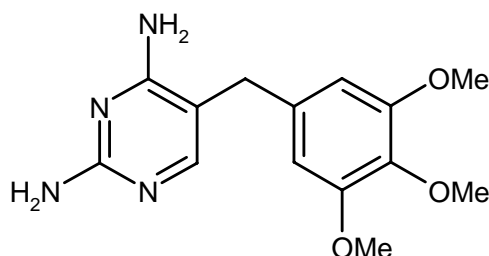


Figura 1. 5 - Estrutura química da trimetoprima.

1.4 Mecanismo de ação dos quimioterápicos

As sulfonamidas atuam inibindo o crescimento de bactérias que requerem o ácido p-aminobenzóico (PABA) para a produção do ácido fólico. Devido à similaridade estrutural (tamanho e forma) (Figura 1.6) das sulfonamidas com o PABA, a enzima bacteriana diidropteroato sintetase, envolvida na incorporação do PABA para a produção do ácido fólico, torna-se incapaz de distinguir as moléculas, fazendo com que as bactérias tentem, sem sucesso, usar as sulfonamidas para obter o ácido fólico.

Os seres humanos não são afetados pela terapia das sulfonamidas porque obtêm o ácido fólico da dieta alimentar.¹²

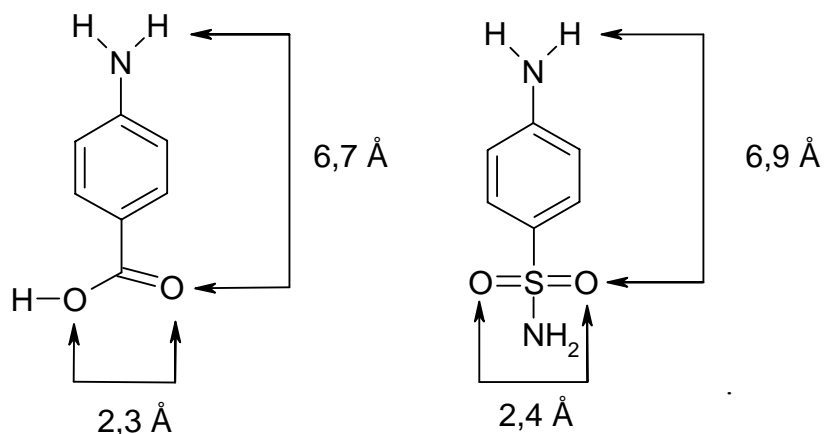


Figura 1. 6 - Similaridade estrutural do ácido p-aminobenzóico e da sulfanilamida.

As sulfonamidas possuem um grupo SO_2 , forte retirador de elétrons, que as torna anfóteras, conforme ilustrado na Figura 1.7. Este comportamento exerce um importante papel na atividade bacteriana; estudos realizados por Bell e Roblin mostraram que a relação entre a atividade bacteriana e a constante de dissociação das sulfonamidas forma uma parábola que alcança o máximo entre os valores de pK_a_2 de 6,0 e 7,5. Assim se conclui que a forma iônica do fármaco é mais ativa que a forma neutra.¹⁷

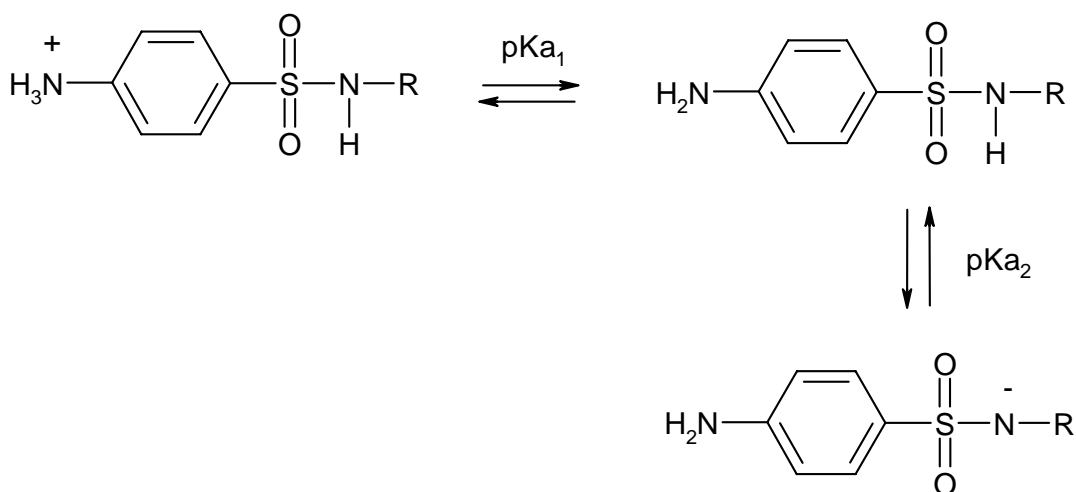


Figura 1. 7 – Comportamento ácido/base das sulfonamidas.

A trimetoprima tem ação, também, no ciclo de obtenção de ácido fólico das bactérias, mas em uma etapa diferente. Este composto inibe a enzima diidrofolato-redutase, que tem a função de reduzir o ácido diidrofolico (ácido fólico) a ácido tetraidrofolico metabolicamente ativo. Este é um co-fator na síntese de purinas, timinas e DNA.

Desta forma, a associação sulfametoxazol-trimetoprima (SMX-TMP) bloqueia duas enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese do ácido fólico no microorganismo, conforme mostrado nas etapas A e B na Figura 1.8.¹⁸

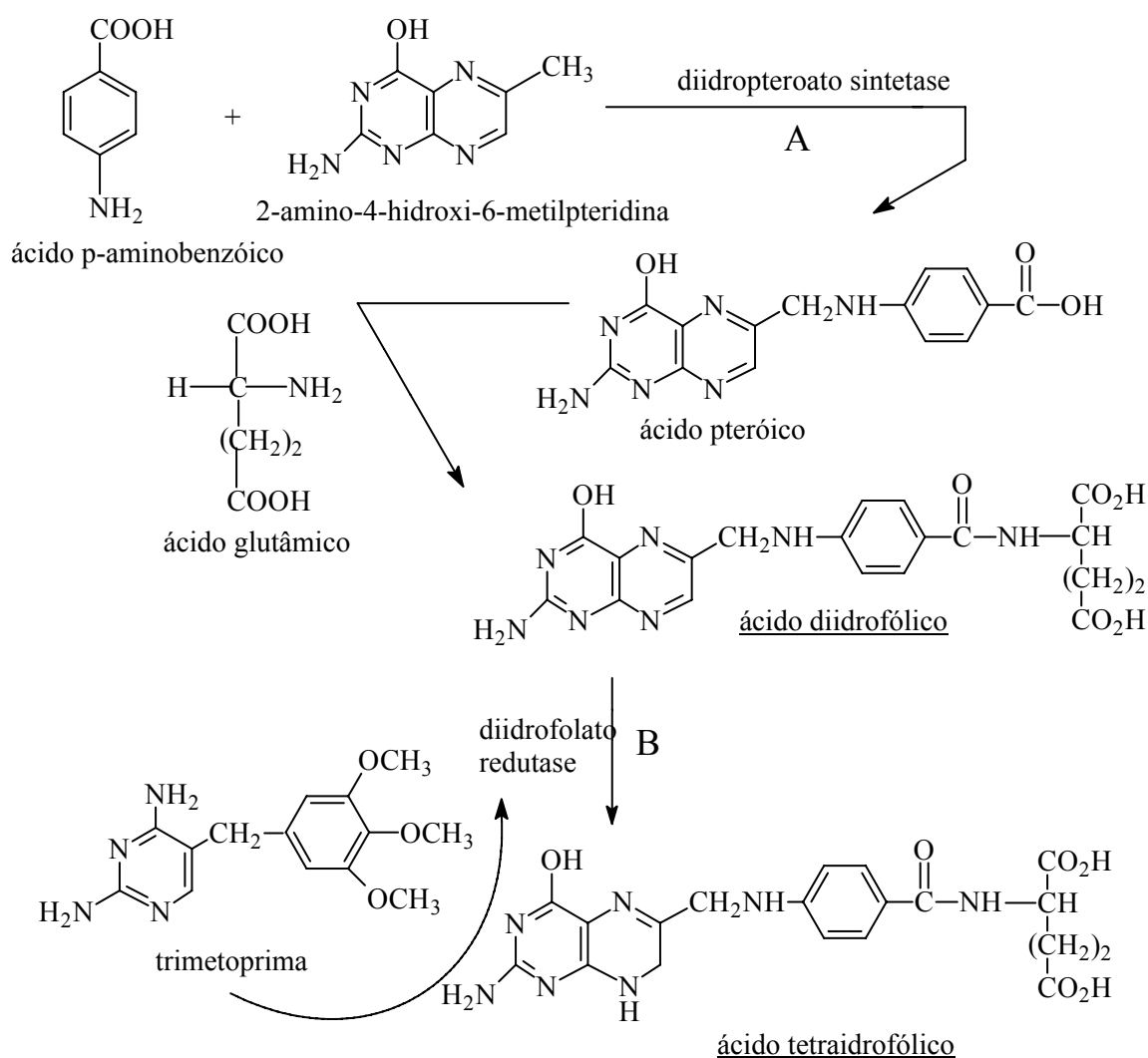


Figura 1. 8 - Síntese bacteriana do ácido fólico; A e B são locais de ação das sulfonamidas e trimetoprima, respectivamente.

1.5 Matriz biológica: ovo

O ovo consiste, basicamente, em duas unidades bastante distintas, com composições diferentes: a clara e a gema. A clara consiste em 56 % da composição total do ovo e é essencialmente uma dispersão coloidal constituída por mais de 13 proteínas, sendo que as principais são a ovoalbumina e a ovotransferrina, que representam 66 % de todas as proteínas da clara. A gema representa 32 % da composição proporcional do ovo e consiste de uma mistura mais complexa, com diferentes nutrientes essenciais, como, vitaminas, lipoproteínas, fosfolipídios, lipídeos (ac. graxos) e minerais. É importante destacar que a composição de ambas as unidades é fortemente influenciada pela dieta alimentar oferecida às galinhas poedeiras. A tabela 1.1 apresenta um resumo dos principais constituintes do ovo.^{2, 5, 19}

A grande quantidade de água (88 %) e a baixa quantidade de lipídeos (0,03 %) fazem com que a clara tenha um caráter polar, enquanto que a gema, devido a grande quantidade de lipídeos (33 %), apresente um caráter apolar. Portanto, são esperadas diferenças de concentração de resíduos de fármacos polares e apolares, entre os dois compartimentos (clara e gema).⁵

As sulfonamidas, por exemplo, compostos com caráter polar, ocorrem em maior quantidade na clara (polar), e a trimetoprima, composto de caráter lipofílico, em maior quantidade na gema (lipofílica). Mas, é importante ressaltar que certos compostos não obedecem a esta distribuição.¹⁹

A classe das tetraciclinas, por exemplo, apresenta o comportamento mais divergente, onde os compostos mais lipofílicos (doxiciclina e minociclina) apresentam mais altos níveis de resíduos na clara, do que na gema (rica em gorduras).¹⁹

Kan e Petz¹⁹ reportam a diferente distribuição entre a clara e a gema, de uma série de fármacos com propriedades distintas e apresentam possíveis explicações para tais distribuições. São considerados os seguintes

fatores: i) ligação protéica às proteínas plasmáticas, como determinante da disponibilidade entre os compartimentos; ii) peso molecular, onde moléculas muito volumosas têm dificuldade de atravessar a membrana celular entre a clara e a gema; iii) solubilidade lipídica, medida pelo coeficiente de partição octanol/água; e iv) valor de pKa, o qual determina a ionização da molécula a um determinado pH, uma vez que, de acordo com algumas teorias, apenas moléculas não ionizadas poderiam penetrar membranas biológicas.

Vários estudos foram realizados para confirmar os itens propostos, no entanto, alguns compostos não apresentaram o comportamento esperado.

Os resíduos de fármacos irão aparecer em ambos os meios (clara e gema), após a sua administração nas galinhas poedeiras. A absorção intestinal, assim como o transporte sanguíneo, são responsáveis pela distribuição dos fármacos na clara e na gema. As propriedades físico-químicas dos fármacos, a fisiologia da galinha e a formação do ovo irão determinar o quanto do fármaco estará presente em cada uma das unidades (clara e gema).¹⁹

Portanto, é importante que análises de resíduos em ovo, sejam realizadas na clara e gema.

Tabela 1. 1 - Composição do Ovo de galinha⁵

Componentes	Gema	Clara
Água (%)	49	88
pH	6,0-6,8	7,6-9,4
Proteínas (%)	16,5	10,5
	Lipovitellinas	Ovoalbumina
	Fosfovitas	Ovotransferrina
	Livetinas	Ovomucoide
	Lipoproteínas	Lisozima
	Avidina	Ovomucina
Lipídios (%)	33	0,03
	Triclicérides (66%)	-
	Fosfolipídeos (28%)	-
	Colesterol (5%)	-
Carboidratos (%)	0,2	0,5
	Glicose	-
Enzimas	Amilase	
	Esterase	
	Fofotase	
	Catalase	
	Peptidase	
Outros	Pigmentos carotenóides; Luteína;xantofiles zeaxantina	

1.6 Análise de fármacos em ovos

A etapa de pré-tratamento das amostras biológicas é, sem dúvida, a etapa mais crítica e trabalhosa durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos de análise.

A análise de fármacos e metabólitos, em fluídos biológicos, é muito comum em CLAE. Porém, a complexidade destas matrizes e a presença de inúmeros compostos endógenos, muitas vezes presentes em concentrações maiores do que as dos analitos de interesse, torna o pré-tratamento das amostras indispensável e particularmente difícil.²⁰

As proteínas presentes nas matrizes biológicas ocasionam o entupimento e perda de eficiência das colunas cromatográficas, devido à obstrução mecânica nos *frits* e a adsorção acumulativa no suporte utilizado.²¹

O pré-tratamento realizado, portanto, visa obter uma amostra enriquecida com os analitos de interesse, livre da interferência de compostos endógenos e da presença de proteínas da matriz biológica.²¹

O pré-tratamento a ser feito depende da matriz com a qual se está trabalhando, bem como a que se aplica o método.

A análise de fluidos biológicos, tais como plasma, soro, saliva, urina, suco gástrico, leite, e particularmente ovo, demandam um tratamento específico. No caso especial do ovo, a grande quantidade e variedade de proteínas e lipídeos (Tabela 1.1) o torna uma das matrizes mais complicadas para ser analisada por CLAE.^{5, 19}

O ovo é uma matriz bastante complexa, sendo, portanto, difícil de ser manipulada durante as extrações e análises cromatográficas, em função da quantidade lipídica e protéica, além da contínua alteração da sua composição, que acarreta dificuldades na reprodutibilidade das amostras.

O desafio na análise de fármacos em ovos consiste em alcançar um pré-tratamento eficiente, que possa eliminar as proteínas e os lipídeos, sem que o mesmo seja sensível às variações da composição da matriz.⁵

Os métodos de pré-tratamento de amostras biológicas podem ser classificados em dois modos *off-line* e *on-line*.

Off-line: os pré-tratamentos classificados como *off-line* são muito utilizados nas análises de fármacos em ovos. Neste caso, os métodos usuais de extração são, a precipitação de proteínas (PP), extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (EFS).⁶

Precipitação de proteínas: as proteínas do ovo são precipitadas com solventes orgânicos (acetonitrila, metanol), ácidos (ácido perclórico) e sais

(sulfato de amônio); a amostra é então centrifugada e o sobrenadante separado e analisado.

Embora seja um método simples, a precipitação de proteínas para análise de ovos não é muito eficaz, podendo ocorrer a formação de emulsão. Sendo assim, esta técnica necessita de uma complementação para uma melhor limpeza da amostra antes da análise cromatográfica, utilizando, por exemplo, extração líquido-líquido ou extração em fase sólida.

Extração líquido-líquido:^{5, 20} este tipo de extração consiste, em uma partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis, sendo normalmente um aquoso e outro orgânico. A solubilidade do composto a ser extraído deve ser considerada, a fim de garantir máxima recuperação do analito, com o mínimo possível de interferentes.

Faz-se uso de elevados volumes de solventes orgânicos, tóxicos e biopoluentes e de etapas demasiadamente complicadas, que implicam em erros analíticos. Além disso, há também sérias dificuldades em se otimizar esse tipo de extração. Esses fatores, somados, levaram à pesquisa de procedimentos alternativos de extração.

Este tipo de extração é sempre utilizado após a etapa de precipitação de proteínas e pode ser repetido várias vezes, de maneira a extrair o máximo do composto de interesse, ou para retirar algum composto interferente.

Extração em fase sólida:^{20, 22} esta extração é, sem dúvida, uma das técnicas mais amplamente utilizadas no tratamento de amostras biológicas. Esse tratamento é realizado através da retenção seletiva dos analitos de uma matriz complexa, nas fases estacionárias utilizadas.

A extração em fase sólida emprega os mesmos princípios da cromatografia líquida e, portanto, é necessária uma adequada seleção da fase sólida e da fase móvel para obter uma extração eficiente.

Esse tipo de extração apresenta as vantagens de proporcionar uma boa recuperação dos analitos e uma eficiente separação dos interferentes; a

utilização de uma reduzida quantidade de solvente orgânico, o que permite a pré-concentração das amostras; pouca manipulação, o que elimina a necessidade de um padrão interno, sendo, portanto, um procedimento menos susceptível a erros e de fácil automação.

Da mesma forma como na extração líquido-líquido, este método também apresenta algumas desvantagens: pode ocorrer uma adsorção irreversível dos analitos sobre as fases estacionárias ou, então, os mesmos eluïrem durante o processo de lavagem; neste caso a fase estacionária seria pouco retensiva para o analito.

Para análise de fármacos em ovos, a extração em fase sólida acontece sempre como a última etapa do pré-tratamento da amostra após a utilização da precipitação de proteínas e da extração líquido-líquido.

DUBOIS *et al.*²³, descreveram um método por LC-ESI(+)-QqQ-MS para a determinação de 5 macrolídeos em ovos, utilizando os três métodos de extração citados acima. Após extração líquido-líquido, com tampão tris a um pH = 10,5, as proteínas foram precipitadas, utilizando ácido acético e tampão de tungstato de sódio. Como última etapa, o extrato foi ainda submetido à extração em fase sólida, para em seguida, ser injetado no sistema cromatográfico.

Da mesma forma, HELLER *et al.*²⁴ desenvolveram um método para a confirmação e quantificação simultâneas de 16 sulfonamidas em ovo, utilizando LC-MS-MS e LC-UV. Neste método foram utilizadas precipitação de proteínas com o solvente acetonitrila e extração, em fase sólida, utilizando um cartucho C₁₈ - Sep-Pack para extração da amostra.

Em ambos os métodos, as etapas do pré-tratamento da amostra foram extremamente longas e laboriosas, tornando-os inviáveis nas análises de rotina.

É importante destacar que, para a análise de fármacos em ovo, a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida

são técnicas complementares para a obtenção de uma melhor “limpeza” da amostra.

Com o objetivo de aprimorar os pré-tratamentos off-line convencionais, novas estratégias e técnicas de pré-tatamento de amostra estão sendo desenvolvidas, como, por exemplo, a extração com fluido supercrítico (EFSC) e a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS).⁸

Extração com fluido supercrítico:²⁵ esta técnica permite eliminar o uso de solventes clorados, reduzir o número de etapas de pré-tratamento requeridas nos métodos clássicos e evitar a formação de emulsão na extração de fármacos em ovos. Utilizando este tipo de extração, PENSABENE *et al.*²⁵, extraíram 3 sulfonamidas de ovos, a 40 °C, utilizando CO₂ no estado supercrítico a 10.000 psi em uma vazão de 3,0 L/min, para posterior análise no sistema cromatográfico. Apesar da eficiente recuperação (87-99%) e reprodutibilidade do método, foi necessário um árduo trabalho de limpeza da amostra (40 minutos).

Dispersão da matriz em fase sólida:²⁶ esta técnica de extração combina aspectos de várias técnicas para abertura da amostra, enquanto também gera um material que possui um caráter cromatográfico único para extração de compostos de uma dada amostra. Dispersão da matriz, em fase sólida, envolve a mistura de amostras viscosas, sólidas ou semi-sólidas com um suporte sólido, como sílica, que pode ser derivada (C₈, C₁₈), ou não. Esta mistura é realizada em um almofariz, onde é pressionada mecanicamente com um pistilo, de forma a promover o rompimento e a dispersão da amostra sobre o suporte. Na etapa seguinte, a mistura é empacotada em uma coluna, de tamanho específico, e o fármaco de interesse é extraído com um solvente apropriado. O eluato é filtrado e injetado no sistema cromatográfico.

BARKER²⁶ apresenta uma ampla aplicação desta técnica para análise de diversos compostos em diferentes matrizes biológicas com destaque

para tecidos. No entanto, para ovos, apenas são encontradas, na literatura, análises envolvendo sulfas.

Mesmo com a diminuição das etapas de pré-tratamento das amostras, as técnicas de extração com fluido supercrítico e dispersão da matriz em fase sólida, além de apresentarem um alto custo, continuam sendo muito laboriosas para serem utilizadas na validação de métodos analíticos. Outro problema frequentemente encontrado com essas técnicas é a baixa reprodutibilidade.

Visando simplificar, minimizar tempo e manuseio da amostra, novos métodos de pré-tratamento, envolvendo a injeção direta de amostras biológicas no sistema de CLAE, estão sendo extensivamente investigados. Este tipo de pré-tratamento de amostras é classificado de **On-line**.^{20, 27, 28}

Os métodos atualmente empregados nas análises on-line são os que utilizam suportes cromatográficos diferenciados, dentre eles, grandes partículas (LPS “large particles supports”) e os meios de acesso restrito (RAM “restricted access media”). Estes diferentes suportes têm em comum a propriedade de excluir as macromoléculas, enquanto que os analitos são retidos por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas.²⁷

Fases LPS:^{27, 28} Estes suportes de extração são empacotados com partículas, cujo diâmetro é de 30-50µm, permitindo o uso de alta vazão no sistema cromatográfico, sem a elevação da pressão. Nestas condições, as proteínas (macromoléculas) eluem rapidamente do suporte, ao mesmo tempo que os analitos ficam retidos nos sítios hidrofóbicos. A alta vazão da fase móvel gera forças de Eddy, as quais impedem que as proteínas ocupem os pequenos canais do suporte (Figura 1.9).

Este tipo de extração foi patenteado em 1997 por QUINN e TAKAREWSKI²⁹, com o nome de cromatografia de fluxo turbulento (CFT).

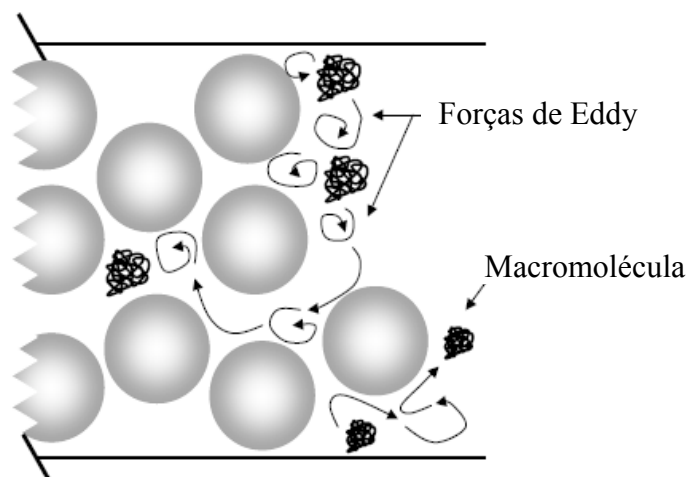


Figura 1.9 - Esquema do mecanismo de exclusão das macromoléculas pelo suporte de LPS.²⁷

Os suportes utilizados nas fases LPS são os mesmos empregados nas colunas convencionais de cromatografia. A principal diferença entre as colunas convencionais de CLAE e as de LPS são os tamanhos das partículas e o diâmetro das colunas. Normalmente, o fluxo utilizado nas colunas de LPS de 1 mm de diâmetro interno é na faixa de 3-5 mL/min.²⁷

As colunas de fase LPS têm sido introduzidas no mercado com diferentes fases estacionárias: (1) fases quimicamente ligadas, como C₈, C₁₈, fenil e (2) fases poliméricas, como a do copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno. As fases poliméricas são comercializadas com o nome de Oásis HLB.²⁷

MULLET²⁸ apresenta uma série de aplicações das fases LPS para análise de diversos fármacos em matrizes biológicas como, plasma, soro, sangue e urina, entre outros. Embora existam diversas aplicações das fases LPS, não foi reportado nenhum estudo envolvendo ovo.

Fases RAM:^{22, 28-30} o princípio fundamental destas fases de acesso restrito é que sua superfície hidrofílica exclui as macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos) no volume morto da coluna, sem acumulação destrutiva, e as micromoléculas (fármacos e seus metabólitos) são retidas e separadas por mecanismos convencionais de cromatografia, como hidrofobicidade, troca

iônica ou de afinidade. Estas fases possuem uma barreira de difusão física e química, unindo princípios de cromatografia de exclusão e de separação para produzir uma Cromatografia de Superfície Discriminante (Figura 1.10).

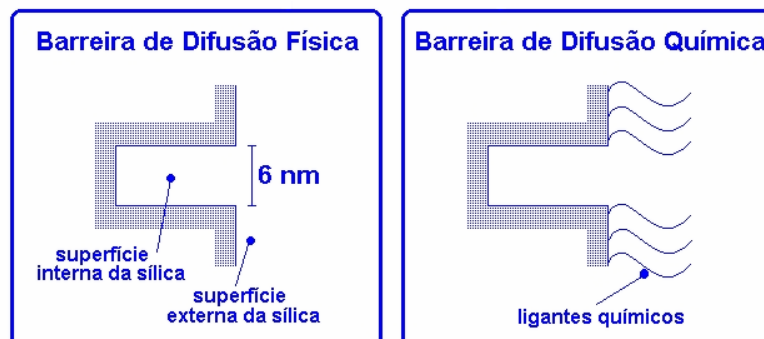


Figura 1. 10 - Desenho esquemático dos princípios fundamentais das colunas RAM.³⁰

As macromoléculas podem ser excluídas por uma barreira física que está relacionada ao diâmetro do poro e/ou por uma barreira de difusão química criada por uma rede de proteínas (ou polímeros) na superfície externa da partícula.

Com relação à topoquímica da superfície quimicamente ligada, as fases RAM são classificadas em dois grupos: fases de superfície unimodal e fases de superfície bimodal.^{31,32}

As *fases de superfície unimodal* apresentam uma topoquímica superficial uniforme, que mostra uma cobertura homogênea, ou melhor, ambas as superfícies externa e interna têm simultaneamente características hidrofílicas e hidrofóbicas. Neste grupo estão incluídas, por exemplo, as fases de sílica porosa recoberta por ligantes combinados, SHP e MFP.

- Sílica porosa recoberta por ligantes combinados

A ChromSpher BioMatrix introduziu, como um novo material de extração para a injeção direta de matrizes biológicas, uma superfície de sílica porosa (tamanho de poro de 13nm) unida a um ligante com propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. Grupos alcanólicos (poliglicidol) do ligante previnem a adsorção protéica sobre a partícula, enquanto grupos fenil produzem

interações hidrofóbicas com pequenos analitos (Figura 1.11).²⁷ Este suporte tem sido aplicado com sucesso para uma série de matrizes complexas.

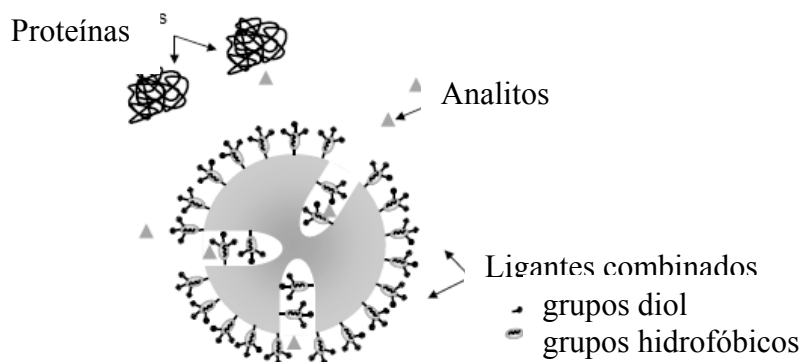


Figura 1. 11 - Sílica porosa recoberta por ligantes combinados.²⁷

- Fases SHP (Shielded *hydrophobic phase*)

Em 1988, GISCH *et al.*³³ introduziram a fase SHP, comercialmente disponível com o nome Hisep (Supelco), onde o material de empacotamento consiste de polímeros de polioxietileno (regiões hidrofílicas) contendo grupos aromáticos disubstituídos (regiões hidrofóbicas), ligados tanto na superfície externa quanto internamente aos poros da sílica (Figura 1.12).

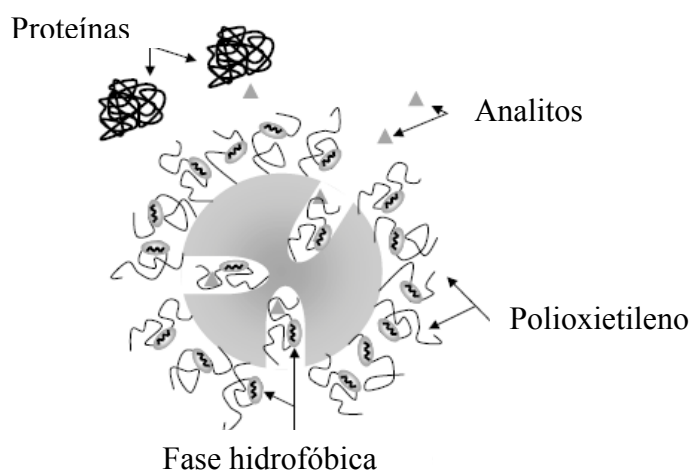


Figura 1. 12 - Fases SHP.²⁷

- Fases MFP (*Mixed-functional material*)

A MFP, desenvolvida por HAGINAKA et al.^{34, 35}, consiste em uma fase mista, onde grupos hidrofóbicos (fenila, butila ou octila) e hidrofílicos (diol) são ligados tanto à superfície externa quanto à interna da sílica (Figura 1.13).

Esses materiais combinam diferentes modos cromatográficos (por exemplo, cromatografia de exclusão e de afinidade) ou diferentes funcionalidades (ligantes hidrofílicos e hidrofóbicos) sobre uma superfície uniforme da sílica.³¹

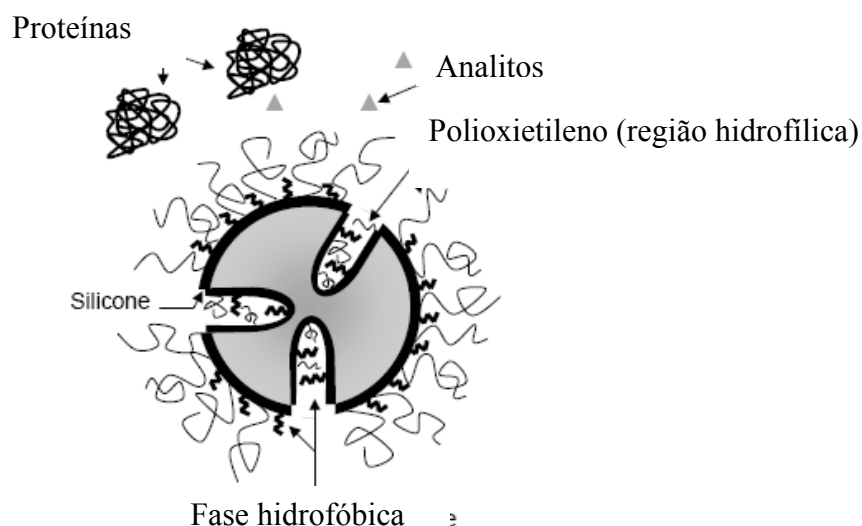


Figura 1. 13 - Fases MFP.²⁷

As *fases de superfície bimodal* possuem uma topoquímica dual, caracterizada pela presença de uma região externa hidrofílica e outra interna hidrofóbica. Aqui estão agrupadas, entre outras, as fases ISRP, ADS, SPS, as fases reversas proteína-imobilizadas e as fases MIP.

- Internal Surface Reversed Phase (ISRP)

O primeiro suporte para a injeção direta de fluidos biológicos foi introduzido em 1985 por HAGESTAM e PINKERTON³⁶, onde a superfície interna dos poros da sílica é coberta com o oligopeptídeo glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (GFF) e a superfície externa é coberta com o ligante diol-glicila. O resultado é uma superfície interna com características hidrofóbicas ou de troca-

iônica e uma superfície externa hidrofílica. Há ainda uma outra geração destas colunas, a GFF II, que devido às modificações sintéticas realizadas no processo de obtenção original, apresenta uma superfície mais homogênea e melhor eficiência, poder de retenção e reprodutibilidade lote-a-lote.³⁷ A Figura 1.14 representa um esquema das superfícies ISRP.

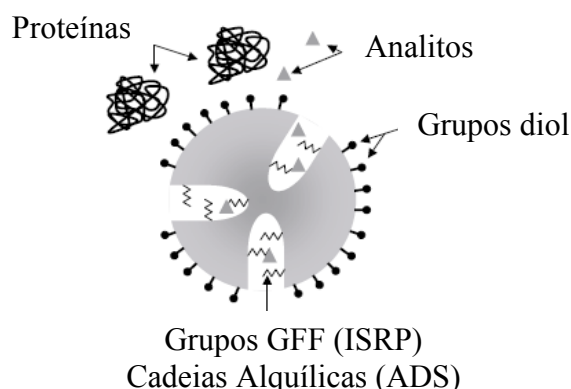


Figura 1. 14 - Internal Surface Reversed Phase (ISRP) com grupos GFF e alquil-diol-sílica (ADS) com cadeias alquílicas.²⁷

- Alquil-diol-sílica (ADS)

Produzida no início dos anos 90, por BOOS *et al.*³⁸, a estrutura do material ADS é similar às partículas GFF. Estas fases apresentam uma superfície externa com caráter hidrofílico, contendo grupos diol, e uma superfície interna hidrofóbica devido à presença de grupos alquílicos (butila, octila, ou octadecila) ligados à sílica (Figura 1.14). Em relação à fase ISRP de Pinkerton, apresentam maior capacidade de retenção. Essas fases estão disponíveis no comércio sob o nome de LiChrospher ADS (Merck Alemã).

Recentemente, RBEIDA *et al.*³⁹ desenvolveram dois novos tipos de fases RAM com propriedades de troca iônica, denominadas XDS (“exchange diol silica sorbends”), para análises de alguns compostos ácidos hidrofílicos como, naproxeno, ibuprofeno e diclofenaco em plasma humano.

Este suporte possui superfície interna composta por grupos sulfonatos ou dietil amino etil, resultando em propriedades de troca catiônica ou

aniônica para compostos de baixo peso molecular, e superfície externa com ligantes diol como nas fases ADS.³⁹

- Semi Permeable Surface (SPS)

As fases SPS foram introduzidas por DESILETS *et al.*⁴⁰ e são preparadas pelo recobrimento da superfície de uma fase reversa (C_8 ou C_{18}) com um polímero hidrofílico, o polioxietileno, que limita o acesso das proteínas à fase estacionária hidrofóbica (Figura 1.15). Na primeira geração das fases SPS, os polímeros eram adsorvidos na superfície externa da fase reversa. Entretanto, devido à presença de solventes orgânicos, na fase móvel, estes se desprendiam do suporte após algumas análises cromatográficas. Isto levou ao desenvolvimento da segunda geração dessas fases, na qual o polímero é ligado covalentemente ao suporte da sílica.⁴¹

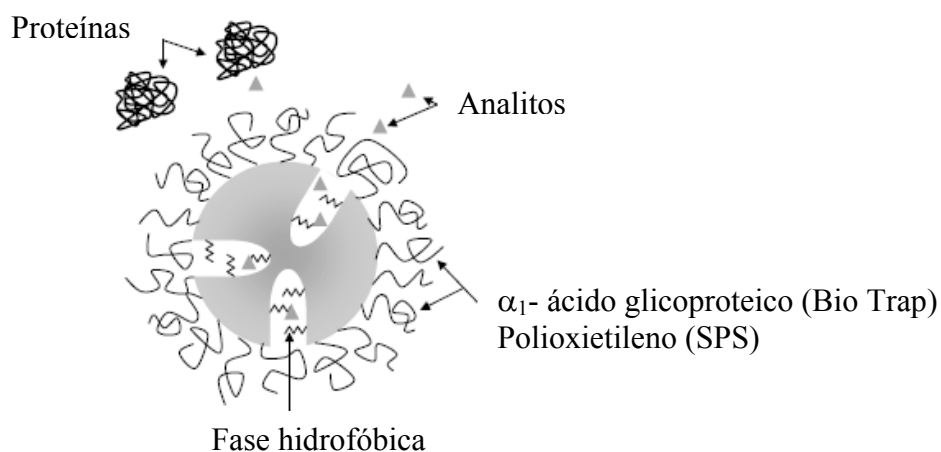


Figura 1. 15 - SPS e suportes de sílica recobertos com proteínas.²⁷

- Fases recobertas com proteínas

Em 1984, YOSHIDA *et al.*⁴² relataram a preparação de uma fase ODS imobilizada com proteína, que consiste em saturar os sítios de adsorção externos de uma sílica de fase reversa (C_{18}) com proteínas plasmáticas humanas desnaturadas (α 1-ácido glicoproteico-AGP). Esta coluna é comercializada com o nome de BioTrap (Figura 1.15).

A superfície externa desta fase é hidrofílica, permitindo a exclusão de proteínas, e os poros são hidrofóbicos o suficiente para reter as micromoléculas.

Nesta mesma classe, também estão incluídas as fases desenvolvidas por MENEZES *et al.*⁴³⁻⁴⁵, onde suportes de sílica (C₈ e C₁₈) são recobertos com albumina sérica bovina (BSA), ou humana (HSA), e estabilizadas através de ligações cruzadas com glutaraldeído, bem como as fases de sílica ou aminopropil-sílica conjugada com avidina.⁴⁶

Recentemente, FELIX *et al.*⁴⁷ desenvolveram uma nova coluna RAM-BSA Quiral para análise dos fármacos temazepan, lormestazepan, oxazepan e lorazepan em plasma humano. A superfície interna da fase RAM é composta do seletor quiral de β -ciclodextrina e a superfície externa com BSA. Foram obtidos excelentes resultados para a exclusão protéica e separação quiral.

- Fases RAM MIP (*molecularly imprinted polymer*)

As fases MIP são compostas de uma rede tridimensional de polímeros com sítios de reconhecimento para determinadas moléculas. O reconhecimento é devido à forma e a mistura de interações de hidrogênio, hidrofóbicas e eletrônicas. Estas fases têm a vantagem de serem estáveis, de baixo custo, de fácil preparo, e podem ser usadas como fases estacionárias quirais ou aquirais.²² HAGINAKA e SANBE⁴⁸ desenvolveram uma RAM-MIP que permitiu a injeção direta e análise dos enantiômeros de vários β -bloqueadores em fluidos biológicos.

As colunas RAM possuem uma ampla gama de aplicação dentro das análises de fármacos e metabólitos em diversos tipos de matrizes biológicas, enquanto são também muito versáteis quanto à sua utilização, podendo ser utilizadas no modo simples ou no modo multidimensional de análise.^{27, 28, 30}

No modo simples, as amostras não tratadas são diretamente injetadas, os interferentes são excluídos e os analitos permanecem retidos com posterior extração por eluição gradiente.^{27, 28, 31}

No entanto, há dificuldades em se trabalhar com as colunas no modo simples, onde a quantificação do analito é dificultada pelas intensas absorções dos componentes presentes nas matrizes biológicas; flutuações na linha de base, ocasionadas pela troca do solvente de exclusão para o de extração e a presença de interferentes que podem co-eluir com os analitos de interesse.^{27,}

²⁸ Para minimizar estes problemas, é utilizado o modo multidimensional.

A cromatografia multidimensional envolve o acoplamento de duas ou mais colunas com modos de separação diferentes. As colunas são escolhidas em função das propriedades dos compostos a serem analisados. Neste caso, as colunas de acesso restrito funcionam como uma pré-coluna e os analitos seletivamente retidos são transferidos, através de uma válvula de desvio, para uma segunda coluna, após a exclusão dos interferentes da matriz biológica. Essa técnica é útil em análise de amostras com muitos constituintes, e pode ser utilizada para fracionar componentes ou possibilitar a determinação de um ou mais componentes específicos em misturas complexas.

SOUVERAIN *et al.*²⁷, CASSIANO *et al.*³⁰ e MULLET²⁸, em recentes revisões, descreveram métodos para a análise de fármacos em diversos tipos de fluidos biológicos, usando colunas de acesso restrito como colunas extratoras. De acordo com estes trabalhos é possível avaliar a grande aplicação do uso das colunas de fases de acesso restrito para a análise e quantificação de fármacos, por injeção direta, em diferentes matrizes complexas. Foram relatados mais de 140 trabalhos na análise de fármacos em diversas matrizes biológicas, sendo estas: plasma, soro, lágrima, cultura de células, urina, bile, tecidos, secreção pulmonar, saliva, microdiálise e leite.

Embora existam diversas aplicações das fases RAM, a análise de compostos em ovo é ainda muito restrita, onde apenas um trabalho é descrito na literatura, utilizando uma coluna RAM-SHP.⁴⁹

1.7 Determinação de sulfonamidas e trimetoprima em ovos de galinha

Muitos procedimentos têm sido desenvolvidos para a determinação de sulfonamidas em alimentos de origem animal, por exemplo: métodos microbiológicos, imunológicos e cromatográficos.^{5, 50}

Os métodos microbiológicos e imunológicos não são considerados específicos e seletivos e embora sejam sensíveis, nas análises de amostras de ovo o maior problema é o resultado de falso positivo pela presença da proteína lisozima.⁵

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se destacado na análise de fármacos em matrizes biológicas, pois permite o desenvolvimento de métodos sensíveis, precisos e seletivos, adequados à aplicação em estudos relacionados à farmacocinética, farmacodinâmica e em testes comprobatórios da ausência de resíduos de antibióticos em alimentos.^{6, 51, 52}

Os métodos cromatográficos descritos na literatura têm empregado técnicas de hifenação da CLAE com o espectrômetro de massas (MS), conseguindo valores na ordem de 2-6 ng/g para a quantificação simultânea de sulfonamidas.^{24, 53 54} Também há estudos de quantificação de sulfonamidas utilizando CLAE-UV⁵² e cromatografia gasosa (CG-MS), no entanto, neste último caso, é necessário uma derivação das sulfonamidas antes da análise.⁵⁵

Os métodos analíticos já descritos apresentam usualmente um complexo pré-tratamento da amostra, onde foram utilizados extensos, numerosos e laboriosos procedimentos, envolvendo a precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

Dentre os outros métodos de pré-tratamentos empregados para análise de sulfonamidas, presentes em ovos, a extração com fluido supercrítico (EFSC) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) também tem sido utilizada.^{25, 56}

PENSABENE *et al.*²⁵ extraíram 3 sulfonamidas do ovo, utilizando extração com fluido supercrítico, e obtiveram resultados de recuperação acima de 80%. Do mesmo modo, utilizando dispersão da matriz em fase sólida, BOGIALLI *et al.*⁵⁶ desenvolveram um método, por LC-MS, para confirmar a presença de 12 sulfonamidas em ovo, tendo obtido valores de recuperação de 77-92 %.

FURUSAWA e KISHIDA^{57, 58} empregaram agentes de precipitação protéica clássicos, como, por exemplo, etanol e ácido perclórico, na precipitação de proteínas do ovo, para utilizar, em seguida, ultra-som, promovendo assim a extração das sulfonamidas e a ultrafiltração para fazer o clean-up da amostra. Este simples e rápido pré-tratamento mostrou resultados satisfatórios de recuperação com valores entre 80 a 97%.

KISHIDA⁴⁹ desenvolveu um método analítico utilizando uma coluna de acesso restrito do tipo SHP, no modo simples de análise, para a quantificação simultânea de 4 compostos: duas sulfonamidas e dois metabólitos. Neste trabalho, o ovo foi tratado com sulfato de amônio, seguido da homogeneização e extração com o auxílio de um equipamento de ultra-som. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante analisado. A etapa de pré-tratamento off-line da amostra foi realizada em 3 etapas e consumiu um tempo menor que 10 minutos.

Dentre os métodos desenvolvidos para análise de sulfonamidas em ovos, o estudo apresentado por KISHIDA⁴⁹ se destaca por utilizar o pré-tratamento mais simples e rápido já empregado em CLAE.

Para o antibiótico trimetoprima, dois estudos são descritos na literatura para sua análise em ovos. ATTA e EL-ZEINI⁵² descreveram um método para a avaliação do tempo de eliminação da TMP e sulfadiazina (SDZ) em claras e gemas de ovos, após a administração via oral (água). As amostras foram extraídas, utilizando DMFS, seguida da separação e análise dos

compostos por CLAE-UV. Os valores de recuperação reportados para o método desenvolvido foram 88 e 89% para TMP e SDZ, respectivamente.

SCHUCH e SCHWAIGER⁵⁹ apresentaram o desenvolvimento de um método para análise de rotina da TMP em leite, tecidos de aves, ovos de galinha e peixe. O pré-tratamento empregado consistiu na utilização da extração líquido-líquido seguido de extração em fase sólida para posterior análise no sistema cromatográfico. O valor de recuperação para as amostras de ovo foi de 80%.

Considerando a importância do desenvolvimento de um método analítico para a análise de antibióticos em ovos de galinha e o reduzido número de aplicações de colunas RAM para análise de fármacos nesta matriz, este trabalho tem como objetivo a quantificação simultânea do sulfametoxazol e da trimetoprima em ovos, por injeção direta de amostras em colunas do tipo RAM-BSA, no modo multidimensional de análise.

Objetivos

*"Se tratamos as pessoas como elas
devem ser, nós as
ajudamos a se tornarem o que elas
são capazes de ser."*

Johann von Goethe

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

1- Preparação de fases de acesso restrito de albumina sérica bovina (BSA), imobilizadas em diferentes suportes (C₈, C₁₈ e fenil);

2- Avaliação da eficiência da exclusão das proteínas do ovo nas colunas RAM-BSA preparadas;

3- Desenvolvimento de um método para a quantificação simultânea do sulfametoxazol e da trimetoprima em ovos, utilizando a coluna RAM-BSA, no modo multidimensional de análise, para o monitoramento de resíduos destes antibióticos.

Procedimento

Experimental

“Ter problemas na vida é inevitável, ser derrotado por eles é opcional.”

Roger Crawford

3. Procedimento Experimental

3.1 Generalidades

Todos os experimentos analíticos foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química-UFSCar.

Foi utilizada uma empacotadora SHANDON para o empacotamento das colunas cromatográficas.

As análises cromatográficas foram realizadas, utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, composto por duas bombas LC 10-ATvp, válvula seletora de solvente FCV-10 ALvp, degaseificador de membrana SHIMADZU DGU-14 A, detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD-10Avp, auto-injetor SIL 10-ADvp, forno CTO 10Svp e válvula de seis caminhos VALCO NITRONIC 7000 para o acoplamento das colunas. O equipamento estava acoplado a uma interface SCL-10 Avp e os cromatogramas foram registrados através de um *software* CLASS-VP 5.0.

As medidas de absorção molecular, na região do UV-visível, foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro HP8452A, com uma cela de vidro de 10 mm de caminho óptico.

A água utilizada no preparo das fases móveis e de soluções tampão foi obtida em um sistema MILLI-Q[®] (MILLIPORE).

Os solventes de grau HPLC (MALLINCKRODT, J. T. BAKER, TEDIA), utilizados nas análises, foram adquiridos da HEXIS e da TEDIA. Os solventes e soluções tampão utilizados no preparo das fases móveis foram filtrados, a vácuo, em um sistema MILLIPORE, utilizando-se membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45 μm e, posteriormente, degaseificados em ultrassom COLE-PALMER 8852.

Os demais reagentes químicos utilizados foram de diferentes marcas: albumina sérica bovina (fraction V powder minimum 98%) e fosfato de tetra butil amônio da SIGMA; fosfato de potássio monobásico, glutaraldeído e boroidreto de sódio da MERCK; ácido fosfórico concentrado J. T. BAKER; acetado de amônio da QEEL; sulfato de amônio da SYNTH e corante Comassie Brilliant Blue da MALLINCKRODT.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de $\pm 0,1$ mg.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, CORNING 430, com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado, CORNING 476436. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 4,01 (MALLINCKRODT) e 7,0 (SYNTH).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON.

As amostras de ovo foram centrifugadas utilizando-se uma centrífuga JOUAN B4i/BR4i termostaticada. A homogeneização das amostras foi realizada em vórtex PHOENIX AP56.

Os ovos utilizados foram comprados em supermercados da cidade de São Carlos-SP e foram usados como controle (branco), estavam dentro do prazo de validade e foram armazenados a 4°C durante todo o desenvolvimento do método. Os fármacos utilizados neste trabalho, sulfametoxazol e trimetoprima, foram gentilmente doados pela empresa farmacêutica “Ouro Fino Produtos Veterinários Ltda” (Ribeirão Preto-SP, Brasil).

3.2 Preparo das colunas RAM-BSA

3.2.1 Sílicas utilizadas

Para o empacotamento das colunas foram utilizadas as seguintes fases hidrofóbicas: octilsílica LUNA (100 Å, 10 µm); octadecilsílica Luna (100 Å, 10 µm) e fenil sílica HYPERSIL (120 Å, 5 µm).

3.2.2 Empacotamento das colunas

Foi preparada uma suspensão com a sílica de fase hidrofóbica em 50 mL de metanol, homogeneizada no ultra-som durante 3 minutos e empacotada em um tubo de aço inoxidável sob pressão de 7500 psi, utilizando-se metanol como solvente. As colunas foram condicionadas em metanol durante 12 horas, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. As quantidades de sílica utilizadas no empacotamento foram, de 2,3 g para colunas de 15 x 0,46 cm d.i, 1,5 g para colunas de 10 x 0,46 cm d.i e 1,0 g para colunas de 5 x 0,46 cm d.i.

3.2.3 Imobilização da BSA nas fases hidrofóbicas

As colunas com fase de acesso restrito (RAM-BSA) foram preparadas de acordo com o procedimento estabelecido no laboratório de síntese orgânica e CLAE, baseado no trabalho já publicado por MENEZES *et al.*⁴³

Após o empacotamento das fases hidrofóbicas e condicionamento das colunas com metanol, estas foram eluídas com solução de KH₂PO₄ 0,05 mol/L (pH 6,0) a uma vazão de 1,0 mL/L, durante 20 minutos, solução de albumina sérica bovina 1,0 mg/mL preparada em uma solução de KH₂PO₄ 0,05 mol/L (pH 6,0) durante 30 minutos, água deionizada por 20 minutos e, em seguida, eluiu-se duas frações de 10 mL de glutaraldeído a 25% (v/v). Após um

período de 12 horas de repouso, uma solução de boroidreto de sódio 1,0 mg/mL foi eluída pelas colunas até que o eluente apresentasse um valor de pH 10. Após 2 horas em repouso, as fases estacionárias revestidas com albumina sérica bovina foram eluídas com água, durante 30 min, a 1,0 mL/min. As colunas RAM-BSA, quando não estavam em uso, foram mantidas refrigeradas a 4 °C.

3.3 Avaliação das colunas RAM-BSA quanto ao poder de exclusão das proteínas do ovo de galinha – Método de Bradford

3.3.1 Preparo do reagente de Bradford ⁶⁰

A solução do corante azul brilhante de Coomassie foi preparada na concentração de 100 mg/L, segundo procedimento descrito por Bradford: dissolveu-se, em um béquer, 50,0 mg do corante azul brilhante (Mallincrodt) em 25,0 mL de etanol e a seguir acrescentou-se 50,0 ml de ácido fosfórico 85% P.A. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar.

3.3.2 Obtenção das amostras excluídas das colunas RAM-BSA e preparo das amostras de referência

O ovo foi homogeneizado (clara + gema) em vortex por 20 s, diluído com H₂O (1:1 v/v) e centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min, na temperatura de 20°C. Após o condicionamento da coluna RAM com 100 % água na vazão de 1,0 mL/min, durante 30 min, injetou-se 100 µL de ovo homogeneizado e diluído. Eluiu-se os compostos macromoleculares do ovo com a água e coletou-se duas frações em balões volumétricos de 5 mL. A primeira fração correspondeu ao tempo de eluição de 0-5 min e a segunda fração ao de 5-

10 min. Em seguida, a coluna foi eluída com ACN/H₂O/ISO (65:20:15 v/v/v) por 10 min, para limpeza de lipídios e compostos endógenos, e condicionada com água por 15 min.

Repetiu-se este procedimento para o volume de injeção de 100 e 200 μ L de ovo, em triplicata. As soluções coletadas foram armazenadas, em frascos de vidro âmbar, na geladeira, no prazo máximo de 12 horas, para posterior análise.

As soluções de referência foram preparadas, adicionando-se volumes de 100 ou 200 μ L de ovo em balão volumétrico de 5,0 mL e completando-se o volume com água. As soluções de referência foram armazenadas, em frascos de vidro âmbar, na geladeira, para posterior análise.

3.3.3. Medidas espectrofotométricas das amostras coletadas e de referência

Pipetou-se 500,0 μ L de uma fração eluída da coluna, adicionou-se 5,0 mL da solução do corante azul brilhante de Coomassie e deixou-se sob agitação por 3 min. Em seguida, transferiu-se um alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se o espectro na região de 300 a 800 nm. Foi selecionado o λ 595 nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína-corante.⁶⁰ As absorbâncias foram medidas contra um branco (água).

O mesmo procedimento foi repetido para todas as frações coletadas, bem como para as soluções de referência.

3.4 Desenvolvimento do método analítico

3.4.1 Preparo das soluções padrão do sulfametoxazol e da trimetoprima

Foram preparadas, individualmente, duas soluções estoque na concentração de 10 mg/mL para o SMX e de 5,0 mg/mL para a TMP, através da dissolução de 100 mg e 50,0 mg, respectivamente, em 10 mL de metanol em balão volumétrico.

A partir destas soluções, foram obtidas, por diluição, duas soluções estoque com os antibióticos combinados nas concentrações (1): 0,25 mg/mL de TMP e 0,50 mg/mL de SMX e (2) 2,5 mg/ml de TMP e 5,0 mg/mL de SMX.

As soluções padrão de calibração e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas por diluição das soluções estoque com os antibióticos combinados, nas seguintes concentrações:

Solução padrão de calibração: 8,00; 16,0; 30,0; 60,0; 120; 200 µg/mL para o SMX e 8,00; 12,0; 15,0; 30,0; 60,0; 100 µg/mL para a TMP.

Solução padrão de controle de qualidade: 9,60; 100; 180 µg/mL para o SMX e 9,60; 50,0; 90,0 µg/mL para a TMP.

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação a de menor concentração da curva de calibração.

2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação a maior concentração da curva de calibração.

3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação a concentração mais alta da curva de calibração.

3.4.2 Preparo das amostras de calibração e controle de qualidade

Aliquotas de 10 μL da solução padrão apropriada foram pipetadas em tubos falcon (15 mL) e o solvente foi evaporado sob ar comprimido. Os analitos foram reconstituídos em ovo (1 mL) (clara+gema), previamente homogeneizado em vortex, por 20 s.

As amostras de ovo fortificadas foram homogeneizadas em vortex, por 15s. Em seguida, adicionou-se acetonitrila (0,5 mL) a cada uma das amostras e novamente homogeneizou-as em vortex por 15s. As amostras, então, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, a 20°C.

Foram transferidas alíquotas de 350 μL do sobrenadante para os *vials* dos frascos para autoinjeter, e injetou um volume de 250 μL no sistema multidimensional de CLAE.

Para avaliar a eficiência de extração, amostras de ovos, livres da presença do analitos avaliados, foram submetidas ao mesmo pré-tratamento citado anteriormente, e então, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram fortificadas nas concentrações dos controles de qualidade (0,096; 1,0 e 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o SMX e 0,096; 0,50 e 0,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a TMP).

3.4.3 Obtenção das curvas analíticas

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 0,80; 0,16; 0,30; 0,60; 1,2; 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o SMX e 0,80; 0,12; 0,15; 0,30; 0,60; 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a TMP.

As curvas de calibração foram obtidas através de regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos antibióticos. Foi considerado um mínimo de seis diferentes concentrações em

cada curva de calibração. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas para obtenção das curvas analíticas:

Bomba 1: vazão de 1,0 mL/min; temperatura de 35 °C

0,00-5,00 min: fase móvel: 100% de TFA 50 mM [exclusão das proteínas pela coluna RAM-C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm)];

5,01-14,00 min: fase móvel: TFA 50 mM:ACN (82:18 v/v) (extração dos antibióticos da coluna extratora);

10,30-14,00 min: fase móvel: TFA 50 mM:ACN (82:18 v/v) (transferência dos antibióticos da coluna extratora para a coluna analítica);

14,01-19,00 min: fase móvel: TFA 50 mM:ACN (70:30 v/v) (limpeza da coluna RAM-C₁₈-BSA);

19,01-29,00 min: fase móvel: 100% de TFA 50 mM (condicionamento da coluna RAM-C₁₈-BSA);

Bomba 2: vazão de 1,0 mL/min; temperatura de 35 °C

0,00-10,30 min: fase móvel: TFA 50 mM:ACN (82:18 v/v) [condicionamento da coluna analítica C₁₈-Luna (15x 0,46 cm)];

10,30-14,00 min: fase móvel: TFA 50 mM:ACN (82:18 v/v) (transferência dos antibióticos da coluna extratora para a coluna analítica);

14,01-29,00 min: fase móvel: TFA 50 mM:ACN (82:18 v/v) (análise do SMX e da TMP), detecção UV em 240 nm para a TMP e 269 nm para o SMX.

3.5 Parâmetros analíticos para validação de fármacos em matrizes biológicas

3.5.1 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada pelas análises de amostras de ovo isenta dos antibióticos SMX e TMP (branco), e de amostras de ovo fortificadas. Cada seqüência de análises continha amostras não fortificadas preparadas em triplicata.

3.5.2 Eficiência de extração (recuperação) e transferência dos analitos

A eficiência de extração foi avaliada através das amostras de controle de qualidade do método.

As amostras foram preparadas, em quintuplicata, como descrito no item 3.4.2, nas seguintes concentrações: 0,096; 1,00 e 1,80 µg/mL para o SMX e 0,096; 0,500 e 0,900 µg/mL para a TMP.

Calculou-se o percentual de eficiência da extração, por comparação dos resultados com as amostras controle, aos obtidos com as amostras preparadas, também em quintuplicata, em ácido trifluoroacético.

3.5.3 Precisão e exatidão

A precisão (intra e interdias) e a exatidão foram avaliadas em três dias não consecutivos, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método, preparadas em quintuplicata como descrito no item 3.4.2. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A

exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem.

A exatidão do método foi também avaliada através do teste cego, onde foram preparadas, em triplicata, e analisadas, duas soluções de concentração desconhecida ao analista.

3.5.4 Limite da quantificação (LQ) e detecção (LD)

O LQ foi estabelecido como a menor concentração de SMXe TMP nas amostras de ovo analisadas cuja precisão não excedeu o valor de 20 % (n = 3) e a exatidão (%) apresentou desvios não superiores a 20 % do valor nominal da concentração.

O LD foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

3.5.5 Estudos de estabilidade

Foi verificada a estabilidade das amostras controle de qualidade do método, preparadas em triplicata como descrito no item 3.4.2, através da comparação dos resultados obtidos de amostras recém-preparadas com aqueles obtidos, após um teste específico.

As amostras de ovo, contendo o SMX e a TMP, foram consideradas estáveis, quando os valores de precisão (CV) e exatidão (%) apresentaram variação de até 15%. Paralelamente, a matriz biológica foi submetida aos mesmos testes de estabilidade (branco de referência).

3.5.5.1 Estabilidade de longa duração

As amostras fortificadas, recém preparadas, foram analisadas e submetidas a armazenamento a -20°C . Após períodos de 24, 48 e 72 horas, foram descongeladas à temperatura ambiente e novamente analisadas. Para avaliar o efeito de congelamento por um longo período, foram analisadas amostras armazenadas a -20°C por 60 dias.

3.5.5.2 Estabilidades durante ciclos de degelo

As amostras fortificadas, recém preparadas, foram analisadas, congeladas a -20°C e submetidas a 3 ciclos de degelo (24, 48 e 72 h). Nos tempos especificados, as amostras foram degeladas à temperatura ambiente, foram retiradas alíquotas de 1 mL e transferidas para outro tubo falcon e preparadas para serem analisadas, conforme descrito no item 3.4.2. Após cada degelo, as amostras foram recongeladas.

3.5.5.3 Estabilidade de curta duração

As amostras fortificadas foram analisadas imediatamente após o preparo e após 4 horas mantidas à temperatura ambiente. O período de 4 horas foi baseado no tempo excedente de duração do preparo das amostras para as injeções no estudo de interesse.

3.5.5.4 Estabilidades das amostras durante a permanência no auto-injetor

Foi avaliada a estabilidade de permanência no auto-injetor das amostras durante o desenvolvimento do método, levando-se em conta o tempo necessário para a construção da curva de calibração (10 h).

3.5.5.5 Estabilidade da matriz biológica

A estabilidade da matriz foi avaliada a partir de amostras de ovo, dentro do prazo de validade, preparadas em triplicata. Estas amostras foram submetidas aos mesmos testes de estabilidade realizados e os resultados analíticos comparados com os obtidos quando da análise do ovo fresco.

Resultados e Discussões

“As dificuldades devem ser usadas para crescer, não para desencorajar. O espírito humano cresce mais forte no conflito.

Willian Ellery Channing

4. Resultados e Discussões

4.1 Preparo das colunas RAM-BSA

Conforme destacado na introdução deste trabalho, a utilização de CLAE na análise de fármacos em matrizes biológicas, como, por exemplo, plasma, soro, urina, leite, ou mesmo o ovo, é bastante complexa, tornando o pré-tratamento da amostra uma etapa fundamental no desenvolvimento do método.

O uso de injeção direta de amostras biológicas oferece várias vantagens em relação aos métodos de pré-tratamento convencionais, tais como, economia de tempo, menor manuseio das amostras biológicas e volume reduzido de lixo químico gerado.

Dentro deste contexto, optou-se por utilizar as colunas RAM recobertas com albumina sérica bovina para a extração do sulfametoxazol (SMX) e da trimetoprima (TMP) em ovos de galinha. Essas colunas apresentaram excelentes resultados, dentro do nosso grupo de pesquisa, para a exclusão de macromoléculas do plasma humano⁶¹⁻⁶³ e do leite bovino⁶⁴⁻⁶⁶, permitindo a quantificação de fármacos por injeção direta no modo multidimensional de análise. Além disso, elas são de fácil preparo e requerem materiais de baixo custo.

Para obtenção das colunas RAM do tipo com albumina sérica bovina (RAM-BSA) imobilizada em sílica hidrofóbica, utilizou-se um método descrito por MENEZES e FÉLIX⁴³⁻⁴⁵, na qual a fase hidrofóbica (Tabela 4.1) foi empacotada em uma coluna de aço inoxidável (10 x 0,46 cm d.i) e a imobilização da albumina sérica bovina (BSA) foi realizada *in situ*, através da cromatografia frontal com uma solução de BSA (2 mg/mL, pH 6).

Tabela 4. 1 - Características físico-químicas das fases estacionárias utilizadas para a preparação das colunas RAM-BSA.

Sílica (tipo)	Fabricante	Tamanho de partícula (μm)	Tamanho de poro (\AA)
C ₈	Luna	10	100
C ₁₈	Luna	10	100
Ph	Hypersil	5	120

Para estabilizar a proteína imobilizada, evitando assim perda de BSA quando da aplicação analítica destas colunas, foi feita a reação das proteínas com glutaraldeído, através da eluição deste reagente a 25% (v/v). Em seguida, para evitar hidrólise da dupla ligação das bases de Schiff formadas e evitar reações posteriores com os grupos aldeído residuais esses grupamentos foram reduzidos com uma solução de 0,1% (m/v) de borohidreto de sódio (Figura 4.1). Após 2 horas, as colunas foram eluídas com água por 1 hora e, em seguida, foram guardadas em geladeira a 4°C até o momento de uso.

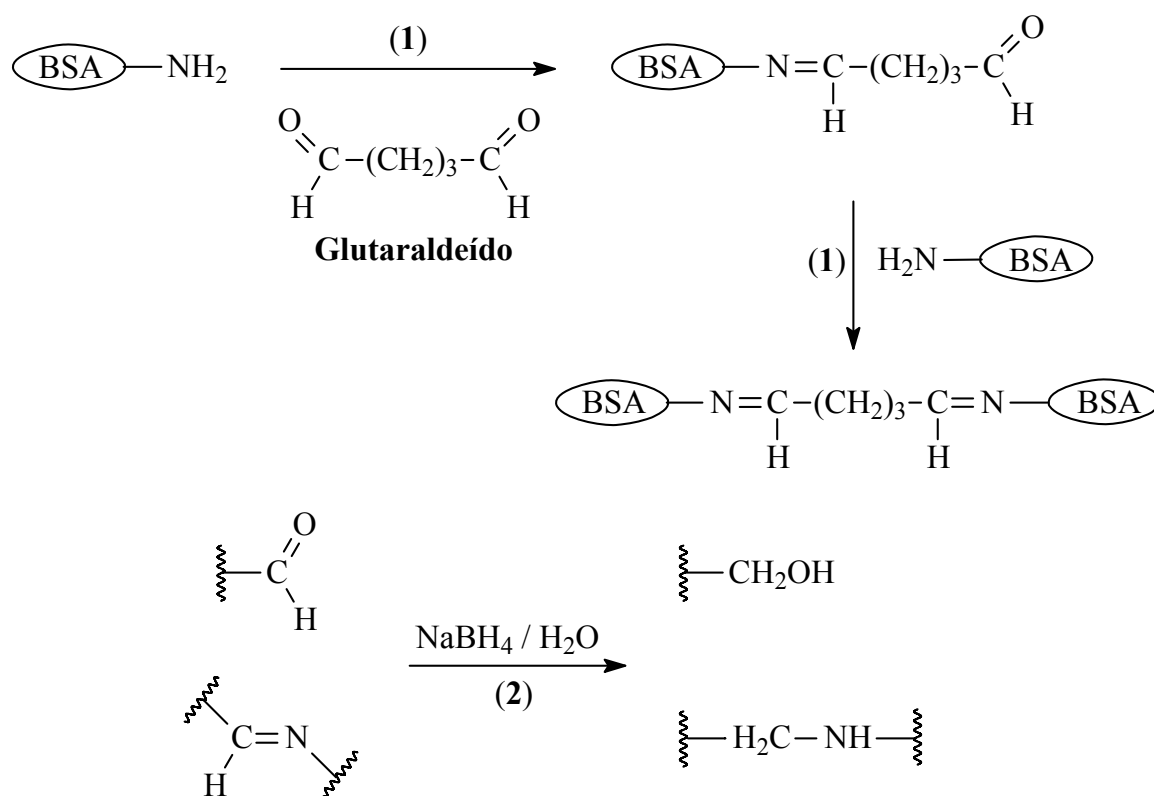


Figura 4. 1 - Esquema de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das bases de shiff entre a BSA e o glutaraldeído; (2) redução das bases de Shiff e dos grupos aldeídos residuais.

4.1.1 Determinação da capacidade de exclusão das proteínas do ovo pelas colunas RAM-BSA

Entre os diversos métodos para determinação de proteínas, foi escolhido o método de BRADFORD⁶⁰ para avaliar a performance na exclusão de proteínas de ovos de galinha pelas colunas RAM-BSA preparadas. Este método tem sido utilizado para determinação de proteínas totais em diversos meios biológicos, tais como, plasma, saliva humana e leite⁶⁷ e baseia-se nas interações de London e hidrofóbicas entre o corante Coomassie Brilliant Blue (CBB) (Figura 4.2) e proteínas de alto peso molecular, ocasionando o deslocamento na absorção do corante de 465 para 595 nm.

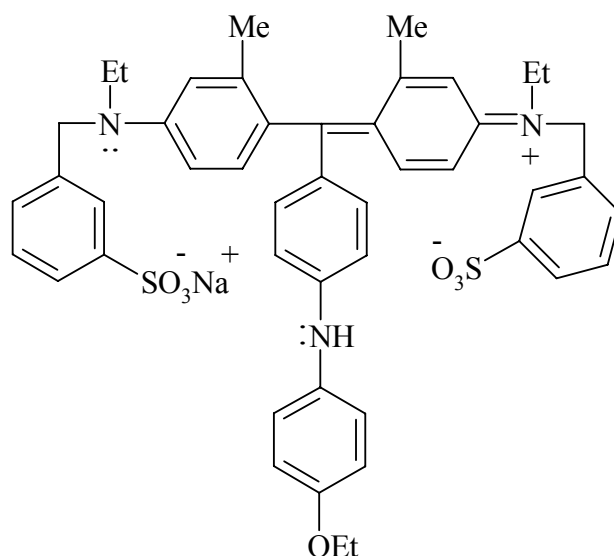


Figura 4. 2 - Estrutura do corante Coomassie Brilliant Blue (CBB)

Para este estudo, conforme descrito no procedimento experimental (3.3.2), o ovo foi diluído em água (1:1 v/v) e centrifugado para evitar o entupimento da seringa do auto-injetor do sistema CLAE e das colunas RAM-BSA selecionadas para o estudo, uma vez que a matriz é extremamente viscosa.

A eficiência das colunas RAM-BSA foi avaliada através da injeção de alíquotas de 100 e 200 μL , do ovo diluído e centrifugado, nas colunas extratoras, utilizando água sem quaisquer aditivos como fase móvel. Após cada injeção, foram feitas duas coletas de 5 mL do eluato, sendo a primeira no tempo de 0-5 minutos e a segunda no tempo de 5-10 minutos.

Para avaliar a exclusão protéica obtida, cada fração coletada foi analisada através da complexação com o reagente CBB, monitorada espectrofotometricamente. A Figura 4.3 ilustra o procedimento realizado.

A eficiência de exclusão das proteínas do ovo em cada coluna foi calculada comparando-se as absorvâncias das amostras coletadas em relação às absorvâncias das soluções de referência que fornecem a quantidade total de proteína presentes no ovo (100%), uma vez que foram obtidas sem passar pelas colunas extratoras.

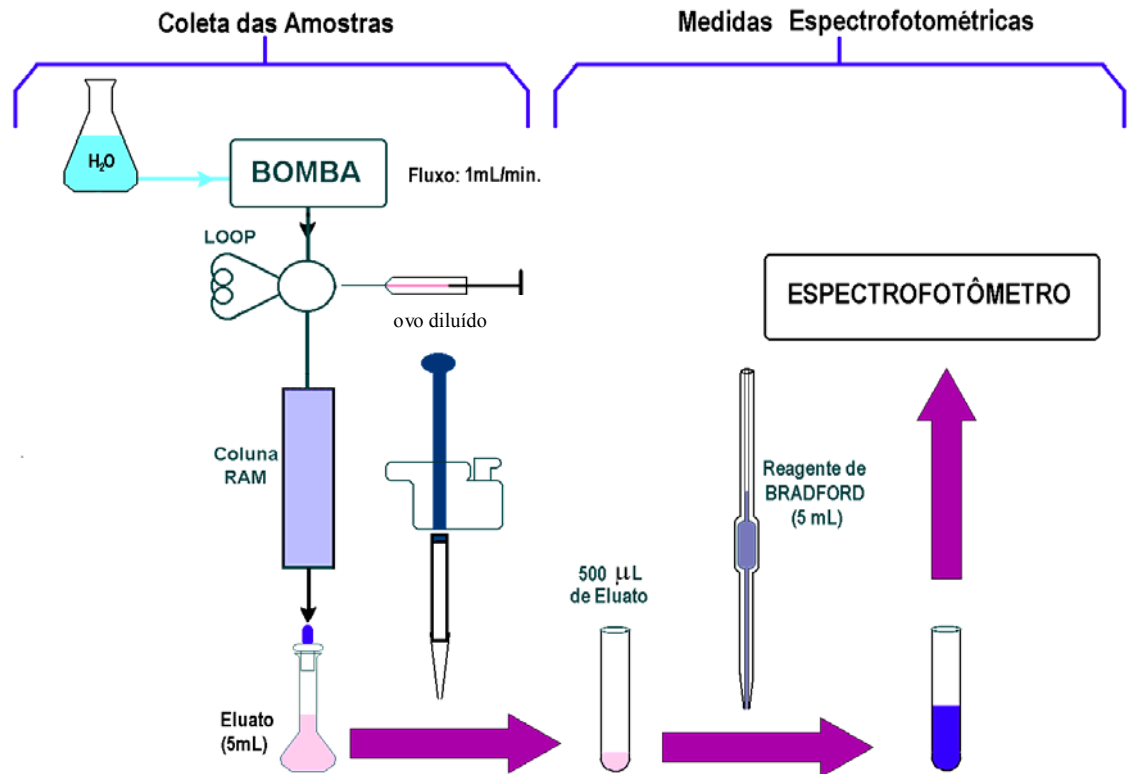


Figura 4. 3 - Procedimento realizado para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas do ovo pelas colunas RAM-BSA.⁶⁸

Os espectros de absorvância obtidos das frações eluídas no tempo de 0-5 minutos, apresentaram similaridade com o espectro da solução de referência (100%) (Figura 4.4), sugerindo, qualitativamente, que nas condições avaliadas, uma maior quantidade de proteína é excluída da coluna RAM-BSA em 5 minutos de análise.

Os espectros de absorvância, referentes às alíquotas coletadas no tempo 5-10 minutos, foram similares ao do próprio corante (Figura 4.5), indicando a ausência quase total de proteínas nesta fração. Isto pode ser confirmado após o cálculo das percentagens de exclusão das proteínas pelas colunas extratoras (Tabela 4.2).

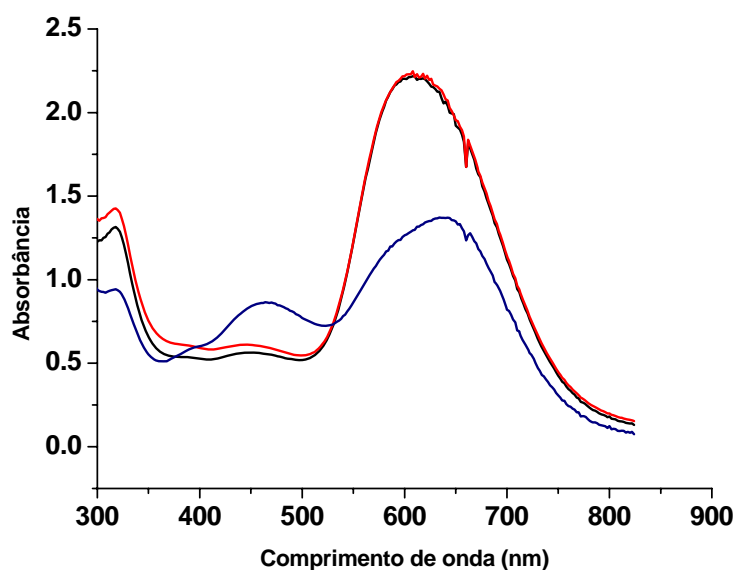


Figura 4. 4 - Espectros obtidos da reação do corante CBB com as amostras do ovo, eluídas da coluna extratora C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i) (100 Å, 10µm). (—) corante CBB com água; (—) CBB complexado com 100µL amostra referência de ovo; (—) CBB complexado com a primeira fração (0-5 min) de 100µL de ovo, eluída da coluna extratora.

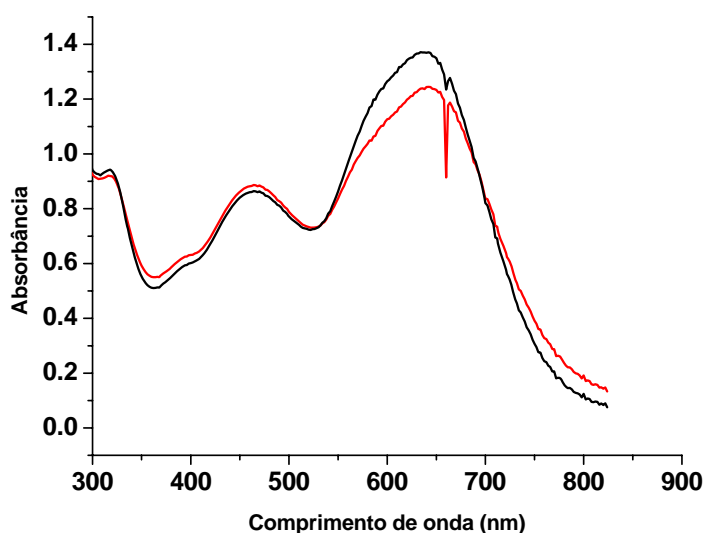


Figura 4. 5 - Comparação entre os espectros obtidos da segunda fração (5-10 min) de 100µL de amostras de ovo, eluída pela coluna extratora C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i) (100 Å, 10µm) (—) e do corante CBB com de água (—).

Tabela 4. 2 - Percentagem de exclusão protéica de amostras de ovo utilizando colunas RAM-BSA na primeira fração coletada (5,0 mL).

Coluna	Volume de Ovo Injetado na Coluna			
	<u>100µL (n=3)</u>		<u>200µL (n=3)</u>	
	média	CV ^a	média	CV ^a
C ₈ -BSA	99,1	0,380	94,1	3,02
C ₁₈ -BSA	98,9	3,82	89,7	3,59
fenil-BSA	92,4	4,20	94,4	1,06

^aCV: Coeficiente de variação; tamanhos das colunas de 10 x 0,46 cm d.i

Os resultados percentuais obtidos mostraram que as três colunas RAM-BSA preparadas apresentaram eficiente poder de exclusão para as proteínas do ovo (Tabela 4.2), utilizando somente água como fase móvel. A média da exclusão, nos primeiros 5 minutos de análise, foi de 95%.

No entanto, a segunda fração coletada não indicou a presença de proteínas, inferindo que 5% (em média) das proteínas podem ter ficado adsorvidas na fase estacionária e/ou nos frits das colunas cromatográficas, conforme já reportado por YU et al.⁶⁹

De acordo com estes autores, após um determinado número de injeções de fluidos biológicos, há a necessidade da limpeza dos frits ou até mesmo a sua substituição, para eliminar problemas de elevação da pressão do sistema cromatográfico, perdas da precisão dos tempos de retenção e da simetria das bandas cromatográficas dos analitos de interesse. Segundo os autores, a adsorção acumulativa de proteínas e/ou gorduras nos frits leva ao surgimento de um volume morto, após um determinado volume de injeção na coluna.

Em nosso grupo de pesquisa, foram observados problemas como o mencionado acima, principalmente, na análise de antibióticos em leite bovino, nas colunas RAM-BSA.⁶⁸

O ovo apresenta uma ampla variedade de proteínas com os mais diferentes pIs (4,5-11,0).⁵ Nas condições utilizadas para o estudo, a proteína

BSA da coluna cromatográfica encontrava-se negativamente carregada, possuindo pI de 4,9. Desta forma, as proteínas presentes no ovo, que possuem pI em torno de 4-6, deverão estar também negativas, e assim, por repulsão com a BSA da coluna, são rapidamente excluídas. Entretanto, no ovo, cerca de 15% das proteínas totais apresentam pIs na faixa de 7-11 e, nas condições avaliadas para exclusão, estas se encontram na sua forma neutra e/ou positivamente carregadas, podendo ocasionar a adsorção na fase estacionária.

A Figura 4.6 ilustra os perfis cromatográficos obtidos da exclusão de proteínas do ovo pelas três colunas preparadas, medidas a 280 nm (absorbância dos aminoácidos tirosina, triptano e fenilalanina das proteínas). Foi utilizada água, como fase móvel, para o processo de exclusão protéica.

Embora só duas frações, de até 10 minutos de coletas tenham sido avaliadas, por se tratar de uma matriz muito complexa, a eluição com água foi feita pelo tempo de 20 minutos antes de se trocar a fase móvel para ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v) para a limpeza de gorduras e componente endógenos. Em nosso grupo de pesquisa esta fase móvel já foi utilizada com êxito no estudo de outras matrizes.^{69, 70}

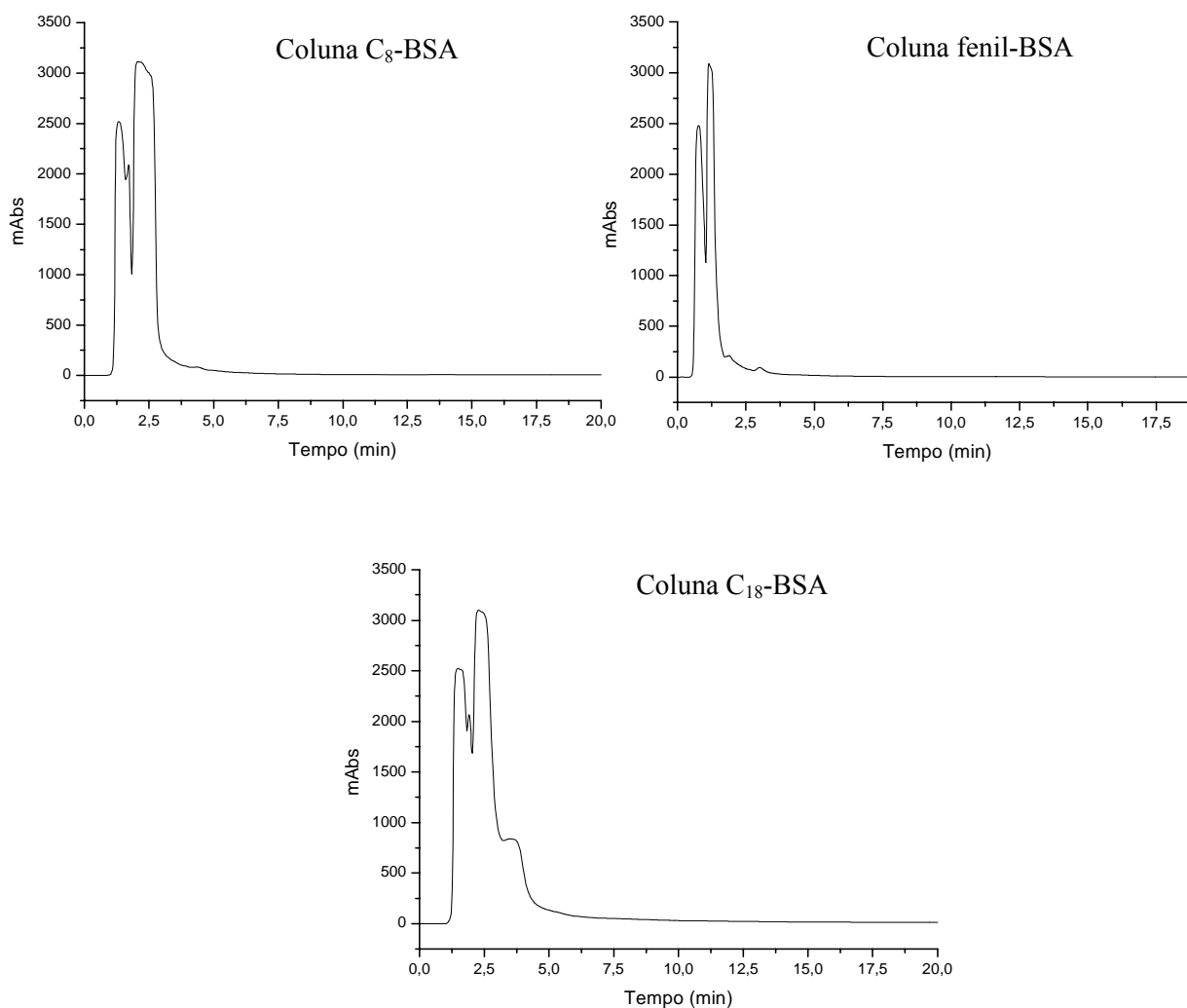


Figura 4. 6 - Cromatogramas dos perfis de exclusão das proteínas do ovo nas colunas RAM-BSA (10 x 0,46cm d.i).Condições Cromatográficas: Fase Móvel: 0-20 min água; 20-25 min ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); vazão: 1,0mL/min; volume de injeção:100μL e $\lambda = 280$ nm

As três colunas avaliadas apresentaram altos percentuais, para a exclusão de proteínas do ovo, em um tempo de 5 minutos, quando eluídas com água a uma vazão de 1,0 mL/min. No entanto, para quantificar SMX e TMP em ovo, foi necessária a avaliação da capacidade de desproteínização de amostras de ovo por essas colunas, utilizando solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L em diferentes pHs (2,5; 3,5; 6,0 e 6,5). O controle da ionização dos analitos foi feito para otimizar a retenção dos mesmos.

A solução KH_2PO_4 foi selecionada por ser menos agressiva que outras soluções, como, por exemplo, a solução de carbonato⁷¹, por apresentar um baixo custo e por possuir uma capacidade tamponante na faixa de 2,0-3,5 e 6,0-8,2 na concentração utilizada.

Os excelentes resultados obtidos evidenciaram que a BSA é suficientemente hidrofílica nas condições cromatográficas empregadas, no entanto, os pHs 6,0 e 6,5 apresentaram uma exclusão das proteínas do ovo em um menor tempo de análise. A Figura 4.7 ilustra os resultados obtidos.

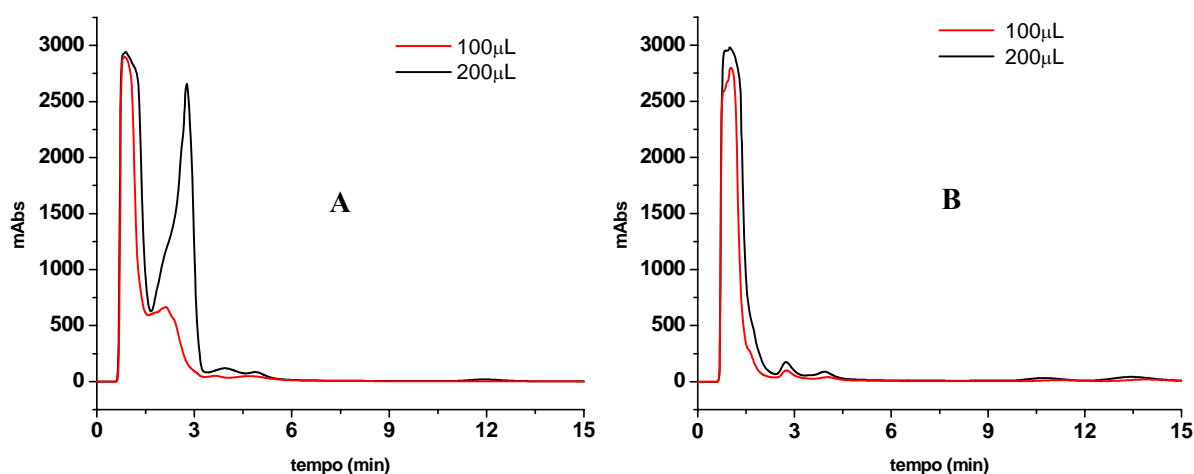


Figura 4. 7 - Cromatogramas dos perfis de exclusão das proteínas do ovo na coluna C_{18} -BSA (10 x 0,46cm d.i) em diferentes pHs. A) KH_2PO_4 0,01M pH=2,5; B) KH_2PO_4 0,01M pH=6,5; vazão de 1,0mL/min e $\lambda=280$ nm.

Durante o estudo da avaliação da performance das colunas RAM-BSA na exclusão das proteínas do ovo, foram observados problemas da elevação da pressão do sistema cromatográfico, o que tornou inviável o uso destas para injeção direta, mesmo com a diluição do ovo com água (1:1) e com a utilização de uma fase móvel de limpeza, após a etapa de exclusão protéica. As colunas RAM-BSA apresentaram pressões acima de 300 kgf/cm², após 10 injeções de amostras de ovo diluído e centrifugado.

No intuito de minimizar o efeito acima citado, foi avaliado o uso de ACN como agente de precipitação de proteínas, antes da injeção das amostras nas colunas RAM-BSA. O solvente ACN foi selecionado como agente precipitante, baseado na sua eficácia em pré-tratamentos off-line em análises de fármacos em ovos.^{5, 50}

Foi adicionado a 1,0 mL de ovo homogeneizado (clara+gema) 0,5 mL de ACN, tendo-se, seguidamente, centrifugado a mistura por 10 minutos, e injetado o sobrenadante no sistema cromatográfico (Figura 4.8).

Foram realizadas injeções repetitivas da amostra, com volume de injeção de 300 μ L, e não foi observada nenhuma alteração da pressão do sistema cromatográfico. Portanto, para a utilização de colunas RAM-BSA na análise de fármacos em ovos de galinha, é necessário um simples pré-tratamento off-line das amostras, para prolongar a vida útil das colunas e permitir o seu uso em análises de rotina.

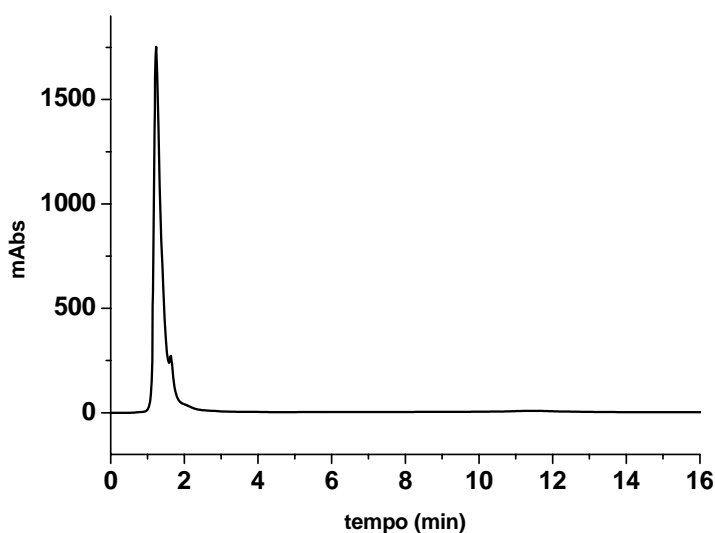


Figura 4 8 - Cromatograma do perfil de exclusão protéica do ovo de galinha na coluna C18-BSA, utilizando 100% de água como eluente à uma vazão de 1mL/min. Volume de injeção 300 μ L e $\lambda = 280$ nm.

4.2 Otimização das condições cromatográficas para utilização das colunas RAM-BSA, no modo multidimensional, na análise dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima.

Os antibióticos SMX e TMP já foram estudados no nosso grupo para o desenvolvimento de um método analítico por injeção direta de amostras de leite bovino em colunas RAM-BSA, no modo multidimensional de análise. A coluna RAM C₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i) foi eficiente para a extração dos antibióticos do leite e proporcionou a obtenção de uma separação cromatográfica adequada na coluna analítica C₈ (15 x 0,46 cm d.i).⁶⁴

Levando em consideração as condições cromatográficas utilizadas no método acima citado (solução de KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0 com 5 % de modificador orgânico (ACN) (0-5 min) e KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0 com 17 % de modificador orgânico (ACN) (5-20 min) a uma vazão de 1,0 mL/min) foi avaliado a exclusão das proteínas do ovo e, também, a extração da SMX e TMP na coluna RAM C₈-BSA, no modo simples de análise. A configuração do sistema cromatográfico utilizado é apresentada na Figura 4.9, e o cromatograma obtido na Figura 4.10. Estes procedimentos foram realizados usando-se soluções metanólicas dos analitos.

De acordo com os estudos realizados no grupo, com colunas RAM-BSA, para os diferentes tipos de fluido biológico, a adição de modificadores orgânicos na fase móvel para exclusão de macromoléculas, tem proporcionado eficiência, reduzindo assim a adsorção destes materiais na fase estacionária e nos *frits* das colunas RAM-BSA.

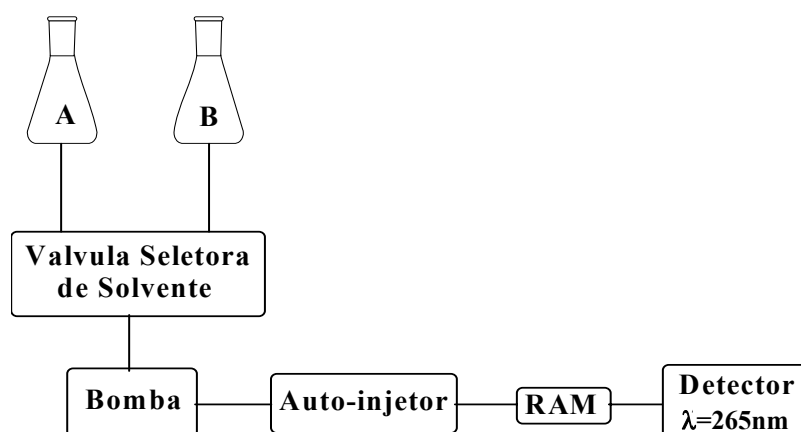


Figura 4. 9 - Diagrama esquemático do sistema utilizado para determinar as condições cromatográficas de exclusão das macromoléculas e extração dos antibióticos.

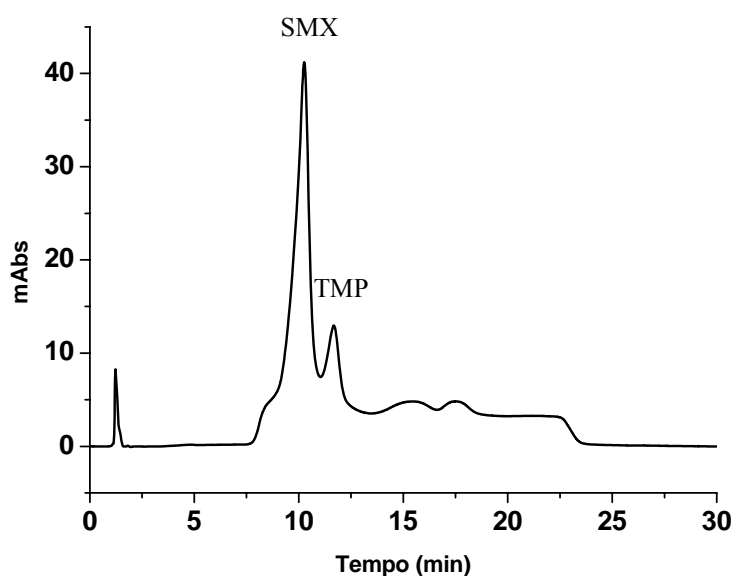


Figura 4. 10 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10 μ g/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₈-BSA. Condições cromatográficas: fase móvel A – KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (95: 5 v/v) 0-5 min; fase móvel B - KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (83: 17 v/v) 5-20 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 50 μ L; λ =265 nm.

Nestas condições, os compostos apresentaram eficiente retenção durante o tempo necessário para a exclusão das macromoléculas, possibilitando o acoplamento com a coluna analítica.

Utilizando-se um sistema cromatográfico, composto por duas bombas, configurado para o modo multidimensional (Figura 4.11), acoplou-se a coluna RAM C₈-BSA à coluna analítica C₈-Luna (15 x 0,46cm d.i) (100 Å, 10µm). A fase móvel utilizada na coluna analítica foi uma solução de KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (82:18 v/v). De acordo com o resultado do cromatograma apresentado na Figura 4.12, foi obtida uma baixa resolução entre os compostos. As condições da fase móvel e de acoplamento entre as colunas, foram, então, novamente otimizadas.

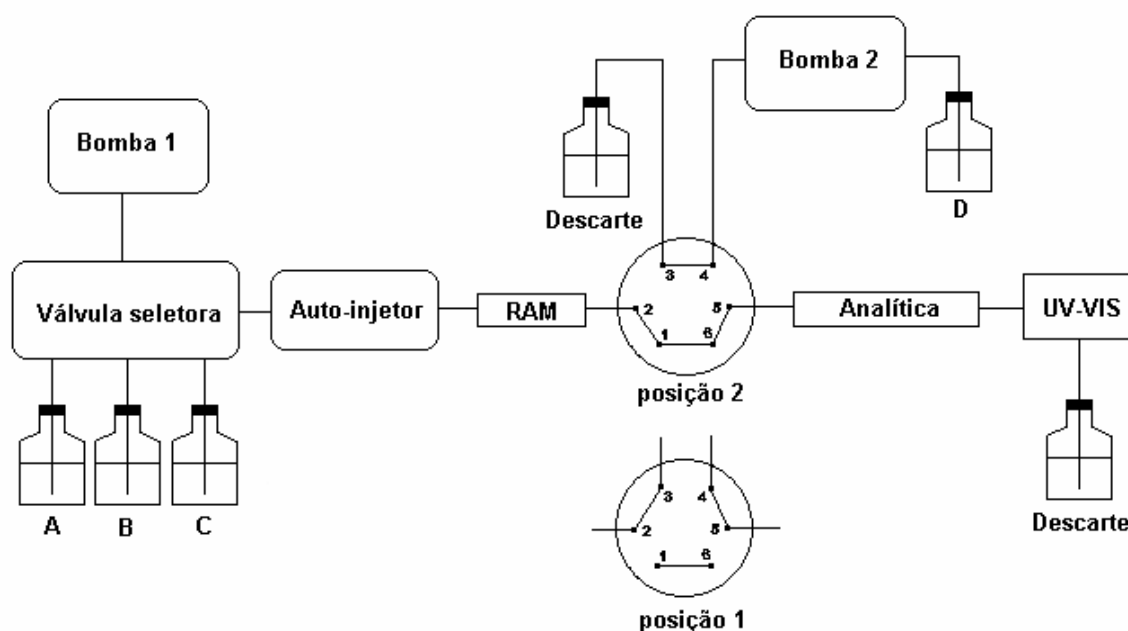


Figura 4. 11 - Diagrama do sistema multidimensional utilizado para o acoplamento das colunas RAM-BSA e analítica. Posição 1 – colunas não acopladas; Posição 2 – colunas acopladas (transferência dos analitos).

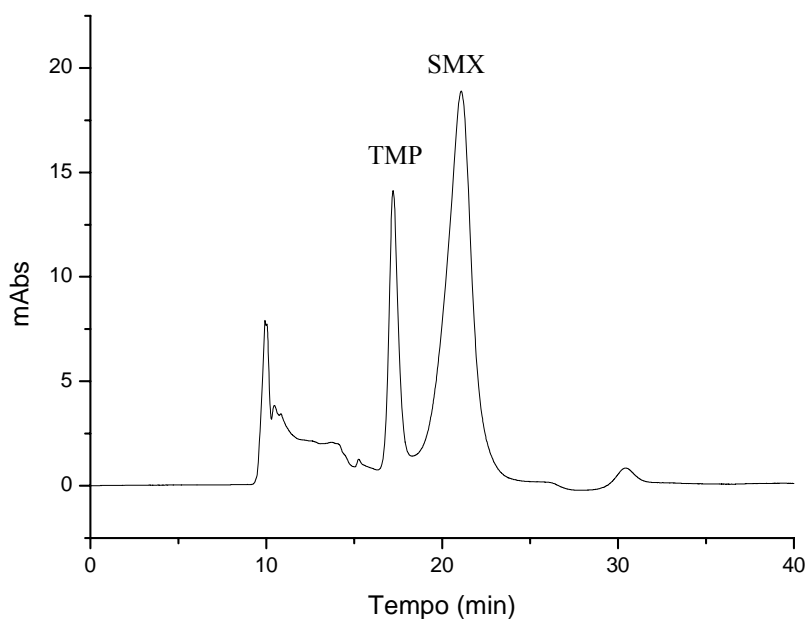


Figura 4. 12 - Cromatograma obtido da análise do SMX/TMP (10 μ g/mL) preparados em solução metanólica, com acoplamento das colunas C₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i) Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) solução KH₂PO₄ 0,01 M pH 6,0: ACN (95:5 v/v) 5 min; (b) KH₂PO₄ 0,01 M pH 6,0:ACN (83:17 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH₂PO₄ 0,01 M pH 5,0:ACN (82:18 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (8-13 min), volume 50 μ L e λ =265 nm.

Em análises envolvendo matrizes biológicas, no modo multidimensional, o ideal é que a transferência do analito de interesse para a coluna analítica ocorra em um menor tempo possível, evitando a interferência de compostos endógenos. Além disso, quando as colunas RAM-BSA e analíticas estão acopladas, ocorre uma mistura das fases móveis, que dependendo do tempo de acoplamento, pode influenciar a análise na coluna analítica.

Os processos físicos que ocorrem durante o acoplamento das colunas, como, por exemplo, a transferência de massa da fase móvel, também são importantes e devem ser levados em consideração, pois interferem diretamente na separação dos analitos na coluna analítica, alargando as bandas cromatográficas. Da mesma forma, para minimizar os processos físicos, devem ser empregados tempos de acoplamento menores para análises em cromatografia multidimensional.

Assim, visando minimizar os problemas acima descritos, foram avaliadas diferentes colunas RAM-BSA e diferentes composições de fases móveis.

Foi avaliada uma coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) nas mesmas condições cromatográficas utilizadas na coluna C₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.).

De acordo com o cromatograma obtido (Figura 4.13), verificou-se que a coluna RAM C₁₈-BSA apresentou um menor tempo de acoplamento para os dois antibióticos (3,8 min) e bandas cromatográficas mais simétricas.

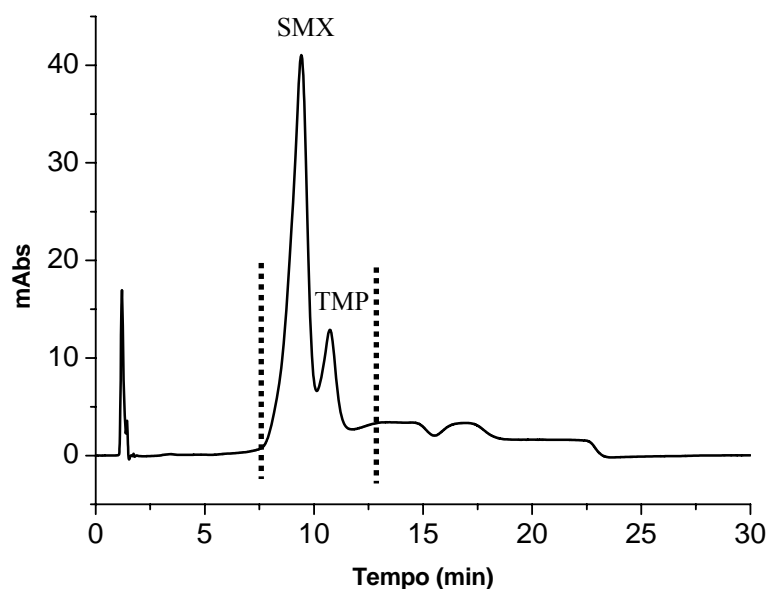


Figura 4. 13 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10 μ g/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA. Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (83:17 v/v); volume de injeção de 50 μ L; vazão 1,0mL/min e λ =265 nm.

Para tentar diminuir ainda mais o tempo de acoplamento entre as colunas, foi avaliada a influência do aumento da força da fase móvel para transferência dos antibióticos.

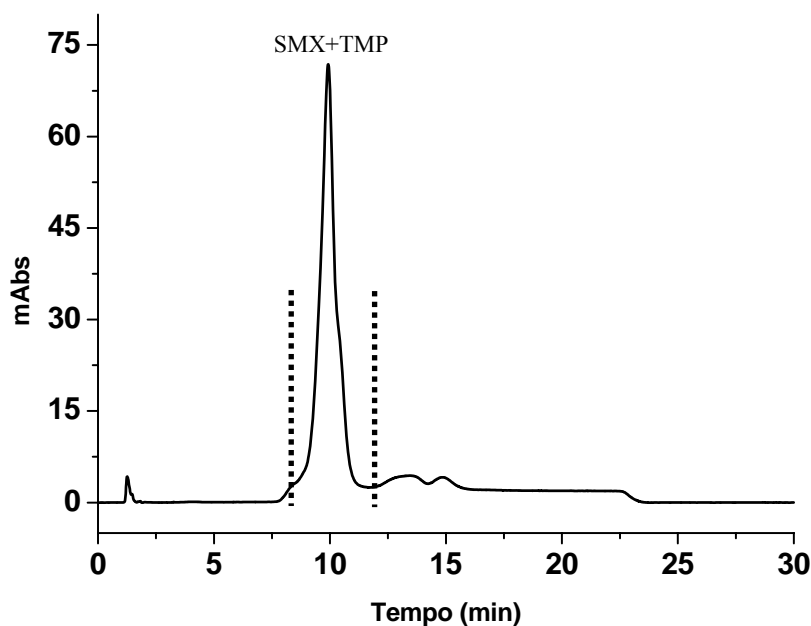


Figura 4. 14 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10 μ g/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA. Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 50 μ L; vazão 1,0mL/min e λ =265 nm

Pode-se verificar, de acordo com o cromatograma obtido (Figura 4.14), que uma maior porcentagem de ACN, na fase móvel de transferência, levou à co-eluição dos analitos, possibilitando uma menor banda cromatográfica e, conseqüentemente, um menor tempo de acoplamento (3,5 minutos) entre as colunas. Sendo assim, esta condição foi utilizada para o acoplamento com a coluna analítica C₈.

Fases móveis constituídas de solução KH₂PO₄ 0,01M nos pHs 5,0 e 6,0 e diferentes proporções de acetonitrila (17-25%) foram avaliadas para separação analítica dos compostos.

Dentre as condições avaliadas, a que proporcionou melhor performance cromatográfica, com adequada resolução, foi a fase móvel com solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (80:20 v/v). A Figura 4.15 ilustra a separação obtida.

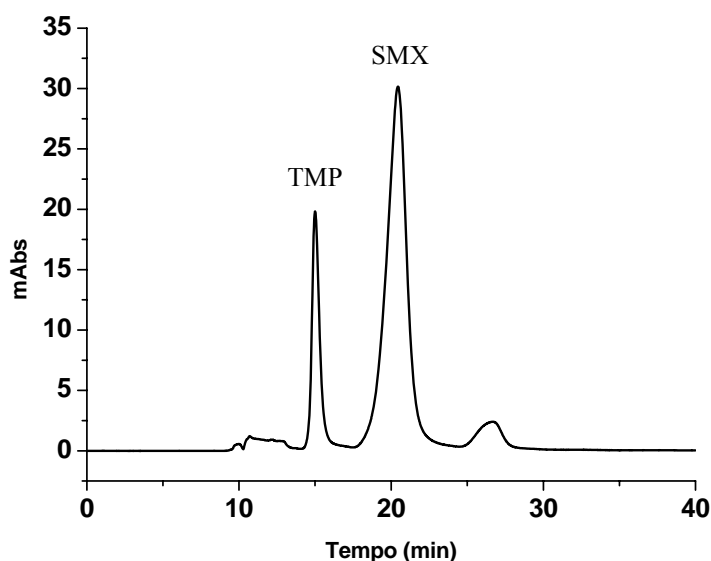


Figura 4. 15 - Cromatograma obtido da análise da amostra de SMX/TMP, preparada em solução metanólica (10 μ g/mL), com acoplamento da coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈-Luna (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (95:5 v/v) 5 min; (b) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (8-11,5 min), volume 50 μ L e λ = 265 nm.

Apesar da adequada resolução obtida, a banda cromatográfica referente à SMX, embora simétrica, era alargada, o que poderia prejudicar a quantificação deste, em concentrações mais baixas. Desta forma, com intuito de minimizar o tempo de acoplamento e diminuir a largura da banda cromatográfica do SMX, foram avaliadas colunas RAM-BSA de 5 cm de comprimento.

4.3 Avaliação das colunas RAM-BSA de 5 cm de comprimento no desenvolvimento do método

As colunas RAM-BSA de 5 cm de comprimento foram avaliadas no nosso grupo de pesquisa, na análise de fármacos em plasma humano,

apresentando excelentes resultados de exclusão de macromoléculas. Este estudo mostrou que a diminuição do tamanho da coluna cromatográfica leva a um menor tempo de exclusão das macromoléculas, sem a perda da eficiência da coluna.⁷⁰

Outra vantagem, que também pode ser levada em consideração, é que a quantidade de fase estacionária presente nesta coluna é menor, o que resulta na diminuição do poder de resolução (menor número de pratos teóricos), e na diminuição da largura das bandas cromatográficas, uma vez que processos físicos são minimizados como, difusão de Eddy, transferência de massa da fase móvel, entre outros. Desta forma, são obtidos menores tempos de transferência dos analitos para a coluna analítica em colunas RAM-BSA de 5 cm, ou menores.⁷²

Desta forma, foram preparadas e avaliadas as colunas RAM-BSA (5 x 0,46 cm d.i) com as fases hidrofóbicas C₈ e C₁₈.

Baseado nos resultados anteriores, foram avaliadas as fases móveis: solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (95:05 v/v), para exclusão de macromoléculas, e a solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v), para extração dos antibióticos.

O comprimento de onda foi também alterado, com o objetivo de alcançar valores mais altos de absorbância, principalmente, para a TMP, que apresenta baixa absorbância em 265 nm. Assim, a partir desta etapa do trabalho utilizou-se o comprimento de onda de 269 nm para o SMX, referente ao máximo de absorbância, e 240 nm para a TMP. O comprimento de onda máximo da TMP é 223 nm, mas esta é uma região do espectro onde há um número grande de compostos que absorvem, dificultando, assim, a quantificação da TMP pela falta de seletividade de detecção.

Dentre as colunas avaliadas, a coluna RAM-C₁₈-BSA (5 x 0,46 cm d.i) foi a que apresentou melhor simetria e largura para bandas cromatográficas dos antibióticos e, conseqüentemente, menor tempo para a transferência dos

analitos (2,3 min) (Figura 4.16). Assim, esta foi selecionada para o acoplamento com a coluna analítica C₈-luna.

De acordo com o cromatograma obtido (Figura 4.17), pode-se verificar uma melhora na simetria e na resolução das bandas cromatográficas dos antibióticos.

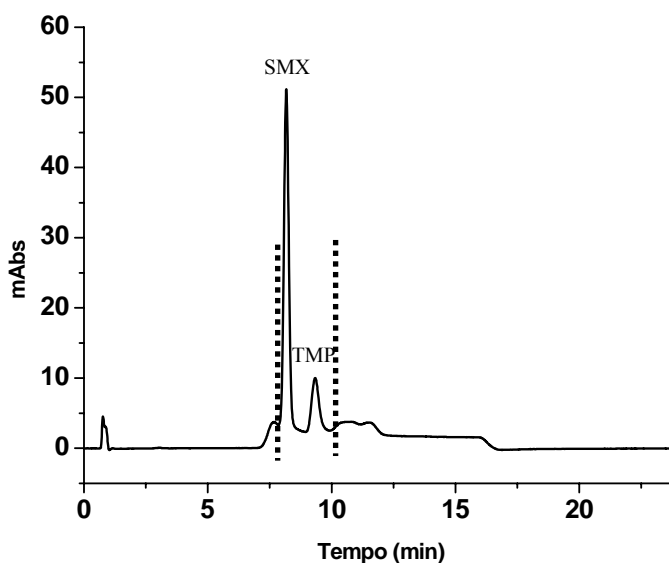


Figura 4. 16 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10 μ g/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA (5 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μ L; vazão 1,0mL/min e λ =269 nm.

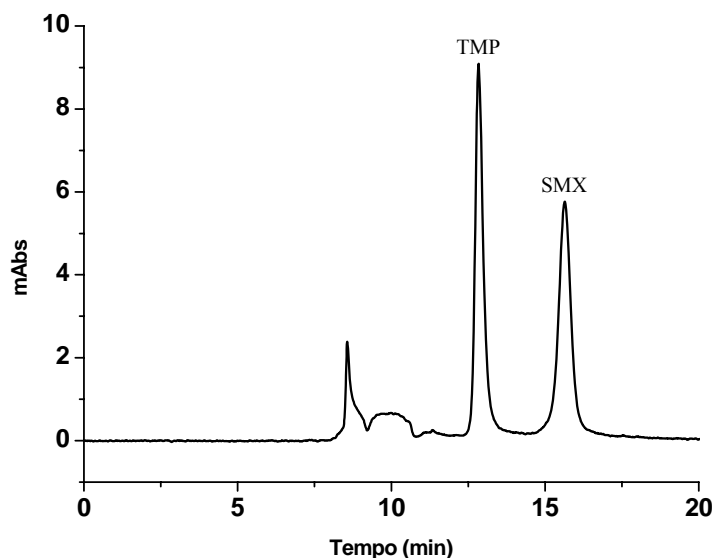


Figura 4. 17 - Cromatograma obtido da análise da amostra de SMX/TMP (10 μ g/mL), preparada em solução metanólica, com acoplamento da coluna C₁₈-BSA (5 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (95:5 v/v) 5 min; (b) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (7.9-10,2 min), volume de injeção 25 μ L e λ = 269nm.

No entanto, foram observados problemas com relação à falta de precisão dos tempos de retenção. Ao longo do dia, foram registrados diferentes tempos de retenção para as bandas cromatográficas (Figura 4.18). Isto pode ter sido causado por falta do controle de ionização dos antibióticos, ocasionado pelo efeito da matriz.

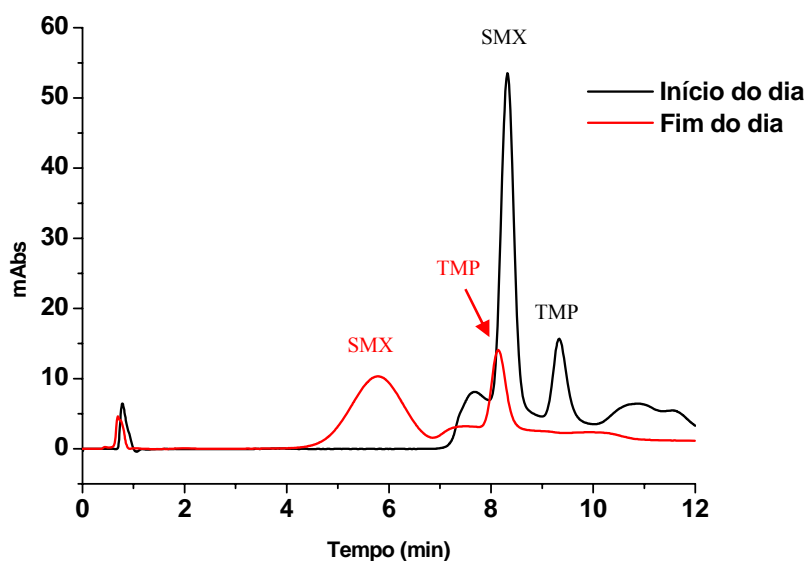


Figura 4. 18 - Cromatogramas ilustrando a perda da precisão dos tempos de retenção, ao longo do dia, na coluna RAM C₁₈-BSA (5 x 0,46cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (95:5 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25µL (10µg/mL em MeOH); vazão 1,0mL/min e $\lambda=269$ nm.

Visando diminuir este problema, avaliou-se a influência de aditivos orgânicos na fase móvel para a exclusão das macromoléculas. Foram avaliados como fase móvel, solução de KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0 e solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02).

De acordo com os resultados obtidos, a diminuição da concentração do modificador orgânico, na fase móvel de exclusão das macromoléculas, não alterou a perda da precisão dos tempos de retenção dos antibióticos. A Figura 4.19 ilustra o cromatograma obtido, com a utilização de solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0).

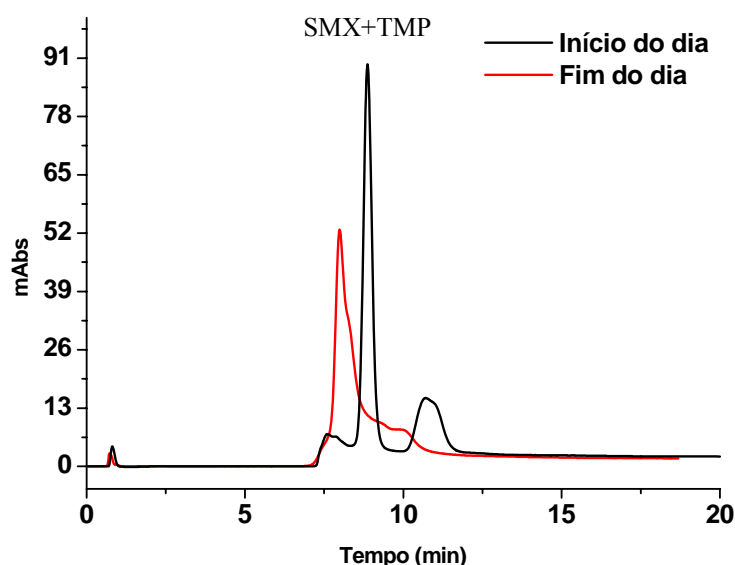


Figura 4 19 - Cromatograma ilustrando a perda da precisão dos tempos de retenção, ao longo do dia, na coluna RAM C₁₈-BSA (5 x 0,46cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0): ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25µL(10µg/mL em MeOH); λ=269 nm e vazão 1,0mL/min.

Outro fator que deve ser levado em consideração, em análises envolvendo compostos ionizáveis, é o controle da temperatura da coluna cromatográfica, uma vez que mudanças na temperatura ambiente podem alterar a ionização dos compostos, levando a uma alteração do comportamento cromatográfico.⁷³ Deste modo, foi também avaliado o efeito da temperatura na coluna RAM C₁₈-BSA.

As análises foram realizadas a diferentes temperaturas: 20, 25, 30, 35 °C (Figura 4.20). No entanto, de acordo com os cromatogramas obtidos, mesmo com o controle da temperatura, foram observados, novamente, problemas de precisão dos tempos de retenção dos analitos.

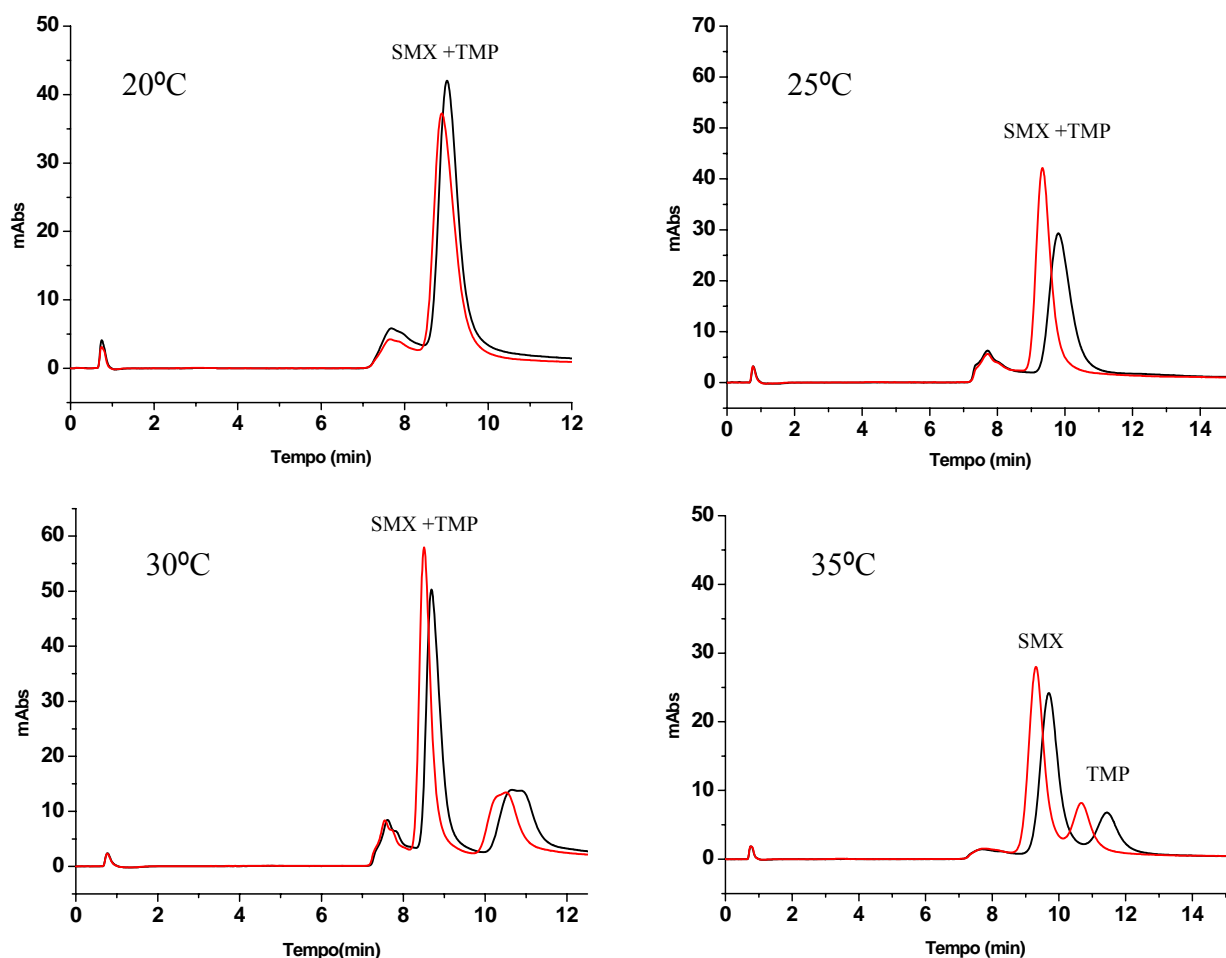


Figura 4. 20 - Cromatogramas representativos das análises de amostras de SMX/TMP(10 μ g/mL), preparadas em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA (5 x 0,46 cm d.i), em diferentes temperaturas. Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (98:02 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μ L; λ =269 nm; vazão 1,0mL/min; (—) primeira injeção e (---) terceira injeção.

Já foi observado, em outro trabalho do grupo, diferenças em retenções de analitos em colunas RAM-BSA, quando são preparadas amostras em solventes orgânicos e em fluidos biológicos.⁶³

Sendo assim, foram preparadas amostras fortificadas de ovo em triplicata e analisadas; e no intuito de remover as gorduras, colesterol e os compostos endógenos, que podem ficar retidos na coluna, foi avaliada, em cada

análise a fase móvel ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v) para a limpeza da coluna, após a etapa de extração dos antibióticos (Figura 4.21).

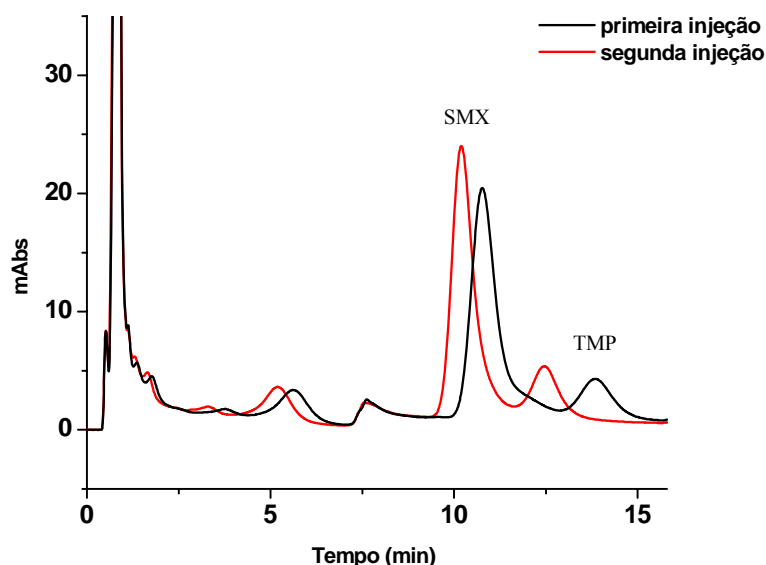


Figura 4. 21 - Cromatograma ilustrando a etapa de extração de SMX/TMP de amostras de ovo (10 μ g/mL) pela coluna RAM C₁₈-BSA (5 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0); 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 25 μ L; λ =269 nm; temperatura 35°C e vazão 1,0 mL/min.

De acordo com os resultados obtidos, a falta de repetibilidade das análises das amostras em ovo foi a mesma anteriormente verificada para as amostras preparadas em solvente.

O uso das colunas RAM-BSA de 5 cm diminuiu o tempo de acoplamento entre as colunas, resultando em uma melhora significativa na resolução e na simetria das bandas cromatográficas; no entanto, foram observados problemas de perda de precisão dos tempos de retenção dos compostos avaliados, e nenhuma das condições cromatográficas avaliadas apresentaram resultados satisfatórios.

Deste modo, foram novamente consideradas análises utilizando as colunas RAM-BSA de 10 cm de comprimento.

4.4 Reavaliação das colunas RAM-BSA de 10 cm de comprimento

As análises anteriormente realizadas, utilizando as colunas RAM-BSA de 10 cm de comprimento, apresentaram resultados de baixa resolução cromatográfica e alargamento da banda cromatográfica do SMX, na coluna analítica (Figura 4.12).

Portanto, foram avaliadas novas condições cromatográficas variando a composição da fase móvel, para melhorar a resolução e o alargamento das bandas cromatográficas.

Para a exclusão das macromoléculas, foram avaliadas fases móveis nas seguintes composições: solução KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0 (100%) e solução KH_2PO_4 0,01 mol/L pH 6,0/ACN (98:02).

Foi obtido um menor tempo de acoplamento das colunas (1,6 min) com ambas as fases móveis avaliadas, favorecendo a etapa de extração dos antibióticos (Figura 4.22). No entanto, a fase móvel com 2% de modificador orgânico foi selecionada para dar continuidade ao estudo, uma vez que a baixa porcentagem de modificador orgânico pode auxiliar na exclusão de macromoléculas e interferentes.⁶⁸

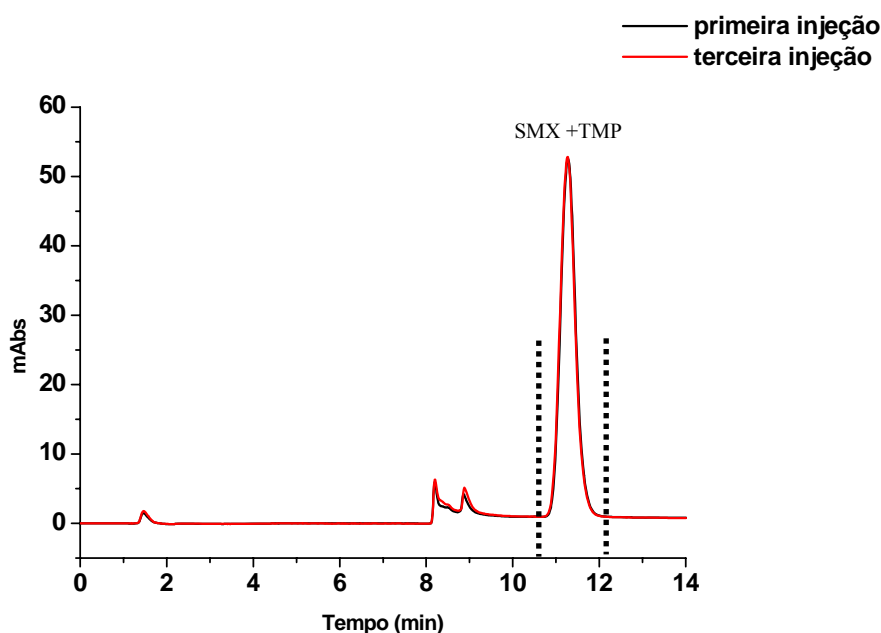


Figura 4. 22 - Cromatograma obtido da amostra de SMX/TMP (10 μ g/mL), preparada em solução metanólica, na coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (98:02 v/v) e 5-20 min: KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); volume de injeção de 25 μ L; λ =269 nm e vazão 1,0 mL/min.

Otimizadas as condições de eluição dos antibióticos da coluna RAM-C₁₈-BSA, foi avaliado o acoplamento com a coluna analítica C₈-Luna (Figura 4.23). Foram consideradas as mesmas condições cromatográficas utilizadas anteriormente.

Adequada seletividade e simetria das bandas cromatográficas foram obtidas para os antibióticos na coluna analítica, confirmando a grande influência do tempo de acoplamento entre as duas colunas, na otimização da separação cromatográfica.

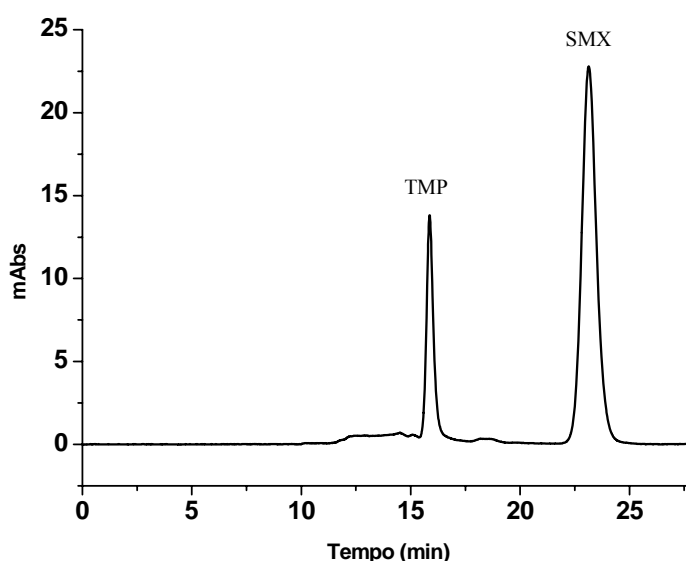


Figura 4. 23 - Cromatograma demonstrando a separação dos antibióticos em amostra preparada em metanol (10 μ g/mL), com acoplamento da coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) KH₂PO₄ 0,01 M pH 6,0:ACN (98:02 v/v); (b) KH₂PO₄ 0,01 M pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (75:20:15) e Bomba 2: (d) KH₂PO₄ 0,01 M pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (10,6-12,2 min), volume 25 μ L e λ 269nm.

Determinada as condições cromatográficas para análise, com o sistema multidimensional, das amostras em solução metanólica de SMX e TMP, foram avaliadas amostras fortificadas de ovo.

Na coluna RAM C₁₈-BSA, o efeito da matriz é observado pelo maior tempo de acoplamento (2,6 min) obtido (Figura 4.24), quando comparado com amostras metanólicas (1,6 min) (Figura 4.21). Além disso, do mesmo modo que para as colunas RAM-BSA de 5 cm, foram observadas alterações do tempo de retenção dos compostos.

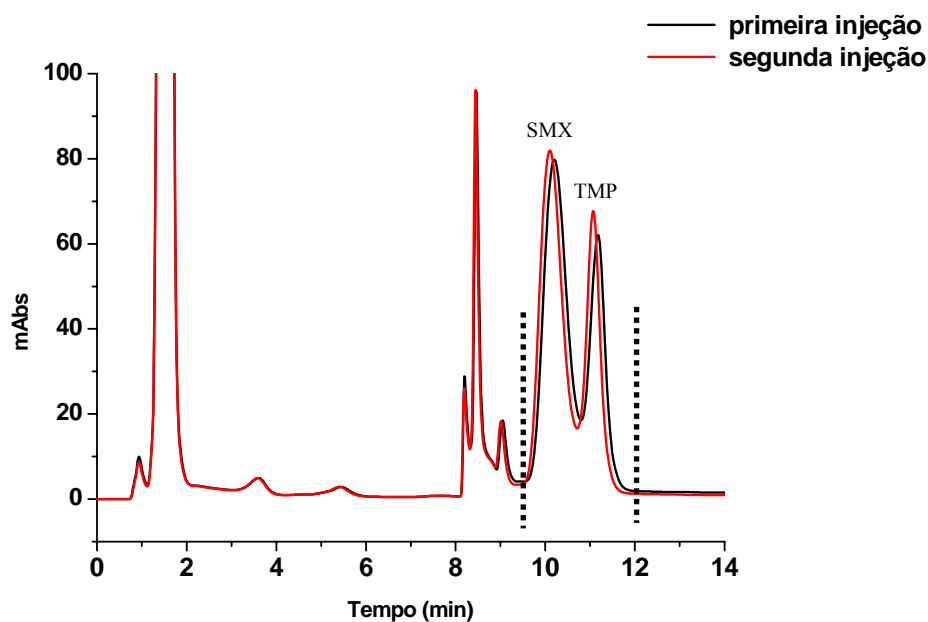


Figura 4. 24 - Cromatograma ilustrando a extração de SXM/TMP de amostras fortificadas de ovo ($10\mu\text{g/mL}$) pela coluna RAM C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 0,01 M pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25: ACN: H_2O :ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de $150\mu\text{L}$; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0 mL/min.

Do mesmo modo, embora tenha sido obtida uma boa resolução dos antibióticos, o efeito da matriz na coluna analítica é também observado pelos problemas de simetria das bandas cromatográficas, onde para o analito SMX são percebidas duas bandas, inferindo uma ionização parcial deste composto (Figura 4.25).

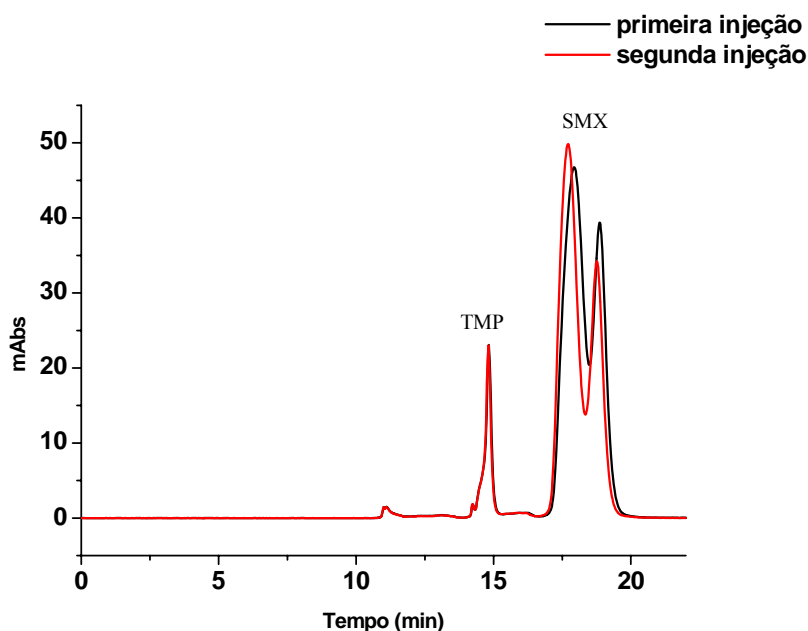


Figura 4. 25 - Cromatograma da análise de amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (10 μ g/mL), com acoplamento das colunas C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); (b) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (75:20:15) e Bomba 2: (d) KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (9,4-12,0 min), volume 150 μ L e λ 269nm.

Baseado nos resultados obtidos pode-se inferir que a matriz, em ambas as colunas do sistema multidimensional, influencia o comportamento cromatográfico dos analitos SMX e TMP.

Análises realizadas em diferentes dias, nas mesmas condições cromatográficas, apresentaram cromatogramas bem distintos para a extração dos antibióticos pela coluna RAM C₁₈-BSA (Figura 4.26), o que demonstra que as condições utilizadas não foram eficientes para minimizar o efeito da matriz.

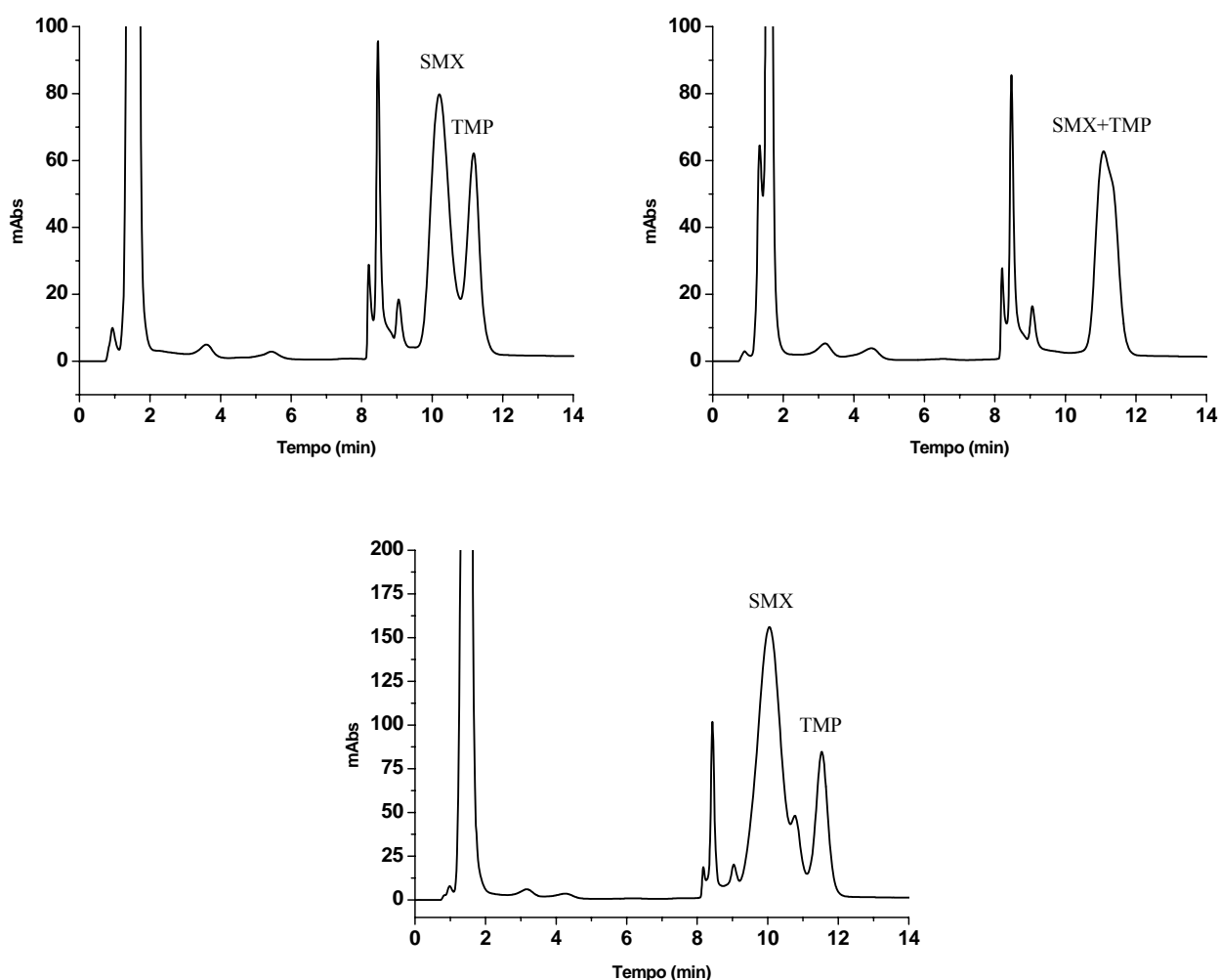


Figura 4. 26 - Cromatogramas ilustrando as extrações de amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 $\mu\text{g/mL}$) pela coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i), em dias diferentes. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH₂PO₄ 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25min: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 150 μL ; $\lambda=269\text{nm}$ e vazão 1,0 mL/min.

Visando minimizar a influência da matriz na análise dos antibióticos SMX e TMP, foi também avaliada uma solução de NH₄Ac (0,01 mol/L, pH 6,0), como fase móvel, mantendo-se a mesma porcentagem de aditivo orgânico (ACN) anteriormente utilizada.

Pode ser observada uma pobre simetria da banda cromatográfica nos cromatogramas apresentados nas Figuras 4. 27 e 4. 28. Estes resultados

demonstram que o uso da solução NH_4Ac (0,01 mol/L, pH 6,0), nas fases móveis usadas, não propiciou o controle da ionização dos analitos.

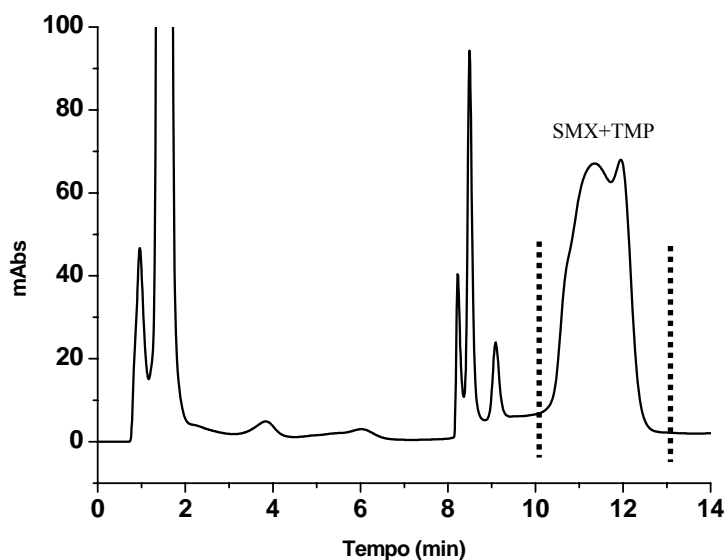


Figura 4. 27 - Cromatograma ilustrando a extração de amostra de ovo fortificada com SMX/TMP (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pela coluna RAM C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução NH_4Ac 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de NH_4Ac 0,01 mol/L pH 6,0:ACN (80:20 v/v); 20-25 min: ACN: H_2O :ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 150 μL ; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0 mL/min.

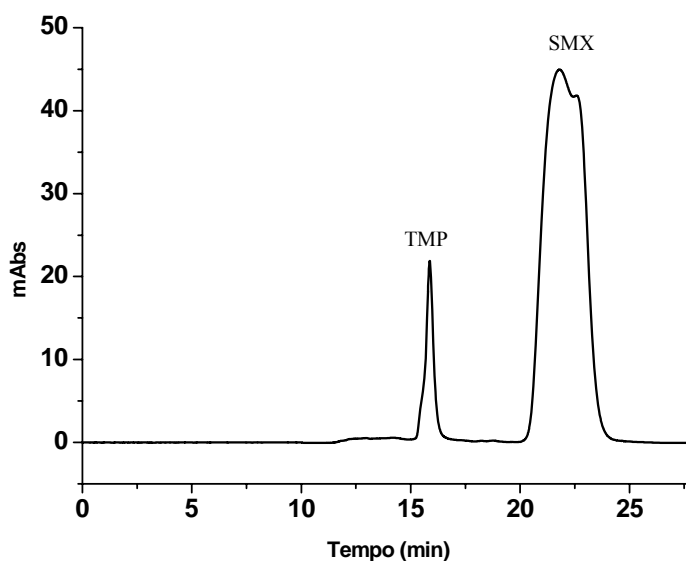


Figura 4. 28 - Cromatograma ilustrando a análise de amostra de ovo fortificada com SMX/TMP (6 $\mu\text{g/mL}$), com acoplamento das colunas C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C_8 (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) 0-5 min NH_4Ac 0,01 M pH 6,0:ACN (98:02 v/v) 5 min; (b) 5-20 min NH_4Ac 0,01 M pH 6,0:ACN (80:20 v/v); (c) ACN:H₂O:ISO (65:20:15) e Bomba 2: (d) NH_4Ac 0,01 M pH 5,0:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (10,0-13,0 min), volume 25 μL e λ 269nm.

Levando em consideração a diferença de propriedades físico-químicas apresentadas pelo SMX (pKas 2,0 e 5.7) e pela TMP (pKa 1,3 e 7,2)⁷⁴, o pH 6,0 utilizado nas análises anteriores visou a obtenção dos compostos na sua forma ionizada, de modo a mantê-los com tempos de retenção semelhantes para uma eficiente extração da coluna RAM-BSA, após a exclusão das macromoléculas. No entanto, neste pH, a influência da matriz foi extremamente relevante na ionização dos compostos, influenciando de forma negativa as análises.

Neste contexto, com a finalidade de tentar minimizar a influência da matriz, solução KH_2PO_4 0,01 M nos pHs 2,5 e 3,5 foram avaliadas como fases móveis na coluna RAM C_{18} -BSA, (Figura 4.29).

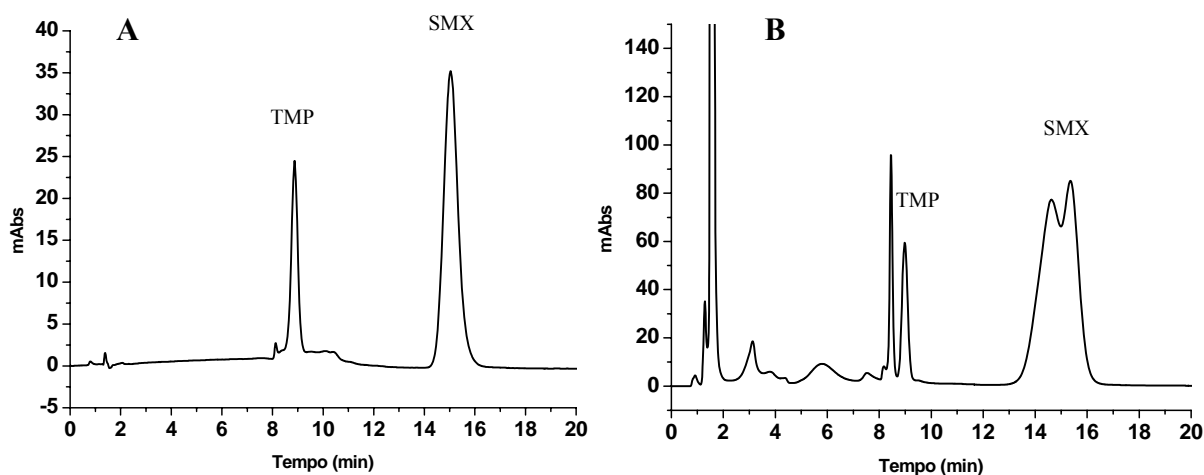


Figura 4. 29 - Cromatogramas das extrações de SMX/TMP, em amostras preparadas em solução metanólica (6 $\mu\text{g/mL}$) (**A**) em amostras preparadas em ovo (6 $\mu\text{g/mL}$) (**B**) pela coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH₂PO₄ 0,01 M pH 2,5:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH₂PO₄ 0,01 mol/L (pH 2,5):ACN (80:20 v/v); 20-25 min: ACN:H₂O:ISO (75:15:10 v/v/v); volume de injeção de 150 μL ; $\lambda=269\text{nm}$ e vazão 1,0 mL/min.

Em solução metanólica, nos dois pHs avaliados, foram obtidos os mesmos perfis cromatográficos com excelente resolução e simetria das bandas cromatográficas (Figura 4.29 A). Para as amostras de ovo fortificado, foi obtida boa resolução entre os compostos, mas, no entanto, observou-se uma duplicação da banda cromatográfica referente à SMX (Figura 4.29 B).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a diminuição do pH da fase móvel também não foi eficiente para o controle da ionização do SMX na matriz.

Além disso, os resultados obtidos mostraram que, nas condições avaliadas, a coluna RAM-BSA só poderia ser utilizada no modo simples de análise, atuando como coluna extratora e analítica, uma vez que com o grande tempo de acoplamento obtido seria totalmente inviável para as análises no modo multidimensional.

Novas condições do preparo da amostra foram então avaliadas, no intuito de minimizar o efeito da matriz para a análise destes dois fármacos.

4.5 Avaliação de agentes precipitantes no preparo das amostras

Em todas as avaliações descritas, foi usado como agente precipitante para as proteínas do ovo, ACN e, embora, se tenha obtido bons índices de recuperação dos analitos, avaliou-se a utilização de outro agente precipitante, solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,0 mol/L. Esta solução foi utilizada com sucesso por KISHIDA⁴⁹, como agente precipitante de proteínas no preparado de amostras de ovo, para análise de sulfonamidas em colunas RAM no modo simples de análise.

A diluição de 1:1 v/v, usada anteriormente, foi mantida, assim como as condições de centrifugação.

O cromatograma obtido da extração dos antibióticos, nas condições previamente estabelecidas (condições descritas na Figura 4. 22), demonstrou que o problema da variação dos tempos de retenções dos antibióticos não foi solucionado. A comparação entre os dois cromatogramas ilustrados, na Figura 4. 30 demonstrou também, que o uso de ACN, como agente precipitante no pré-tratamento da amostra, é mais eficiente que a solução de sulfato de amônio.

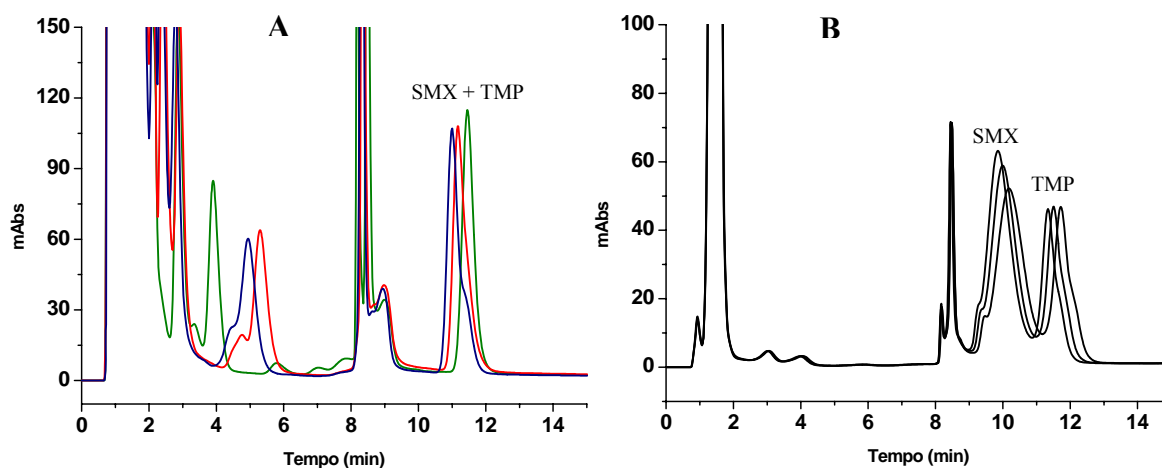


Figura 4.30 - Cromatogramas das replicatas ($n = 3$) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP ($6 \mu\text{g/mL}$) na coluna RAM C_{18} -BSA ($10 \times 0,46 \text{ cm d.i}$) utilizando como agente de precipitação: (A) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 mol/L) e (B) ACN. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol/L}$ pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol/L}$ (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25min: ACN: H_2O :ISO (75:20:15 v/v/v); volume de injeção de $150 \mu\text{L}$; $\lambda=269\text{nm}$ e vazão $1,0 \text{ mL/min}$.

A influência da fase móvel utilizada para limpar a coluna extratora também foi avaliada. Assim, isopropanol (ISO) foi substituído por acetonitrila e foi usada ACN: H_2O (70:30 v/v).

O solvente isopropanol (ISO), por ser bastante viscoso, poderia ocasionar problemas no re-condicionamento da coluna, durante as análises, acarretando em perdas dos tempos de retenção dos antibióticos. No entanto, não foram observadas melhoras utilizando a nova fase móvel para limpeza das colunas RAM. A falta de precisão nos tempos de retenção foi mantida.

O controle da temperatura, na coluna RAM C_{18} -BSA, foi também avaliada, utilizando tanto a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($4,0 \text{ mol/L}$), quanto ACN no pré-tratamento das amostras. A temperatura foi mantida em 35°C .

Para as amostras tratadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, apesar da maior quantidade de interferentes observados no cromatograma, foi alcançada uma maior repetibilidade dos tempos de retenção para as análises, em um mesmo dia.

No entanto, foi novamente observada a perda de precisão nos tempos de retenção nas análises, em dias consecutivos (Figura 4.31).

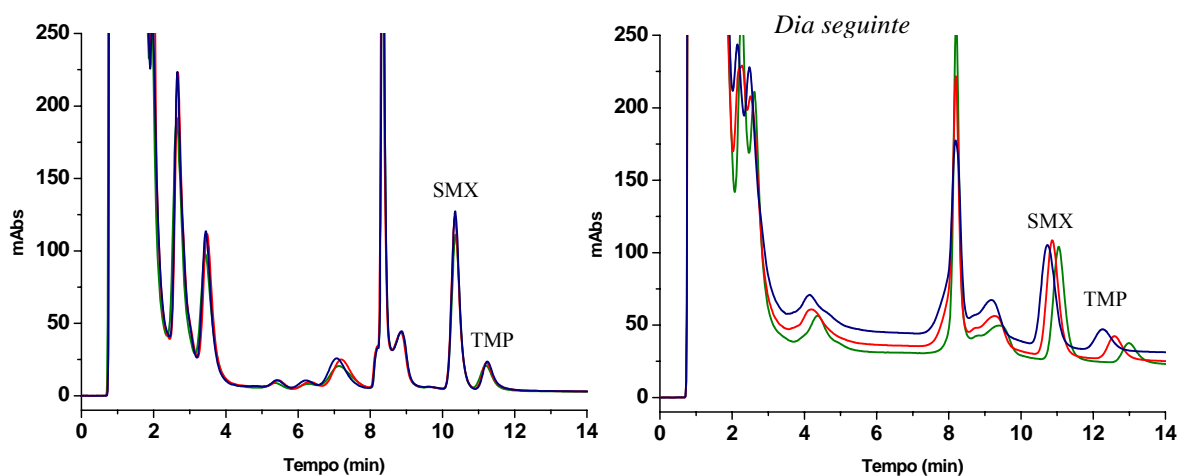


Figura 4. 31 - Cromatogramas das replicatas ($n = 3$) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP ($6 \mu\text{g/mL}$) na coluna RAM C_{18} -BSA ($10 \times 0,46 \text{ cm d.i}$), utilizando o agente de precipitação de proteínas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($4,0 \text{ mol/L}$) no pré-tratamento das amostras. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol/L}$ pH $6,0$:ACN ($98:02 \text{ v/v}$); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol/L}$ (pH $6,0$):ACN ($80:20 \text{ v/v}$); 20-25min: ACN: H_2O ($70:30 \text{ v/v}$); volume de injeção de $150 \mu\text{L}$; temperatura 35°C ; $\lambda=269 \text{ nm}$ e vazão $1,0 \text{ mL/min}$.

Para as amostras tratadas com ACN, além da perda de precisão dos tempos de retenção, também não foi possível encontrar um eficiente controle da ionização dos antibióticos, na coluna RAM C_{18} -BSA (Figura 4.32).

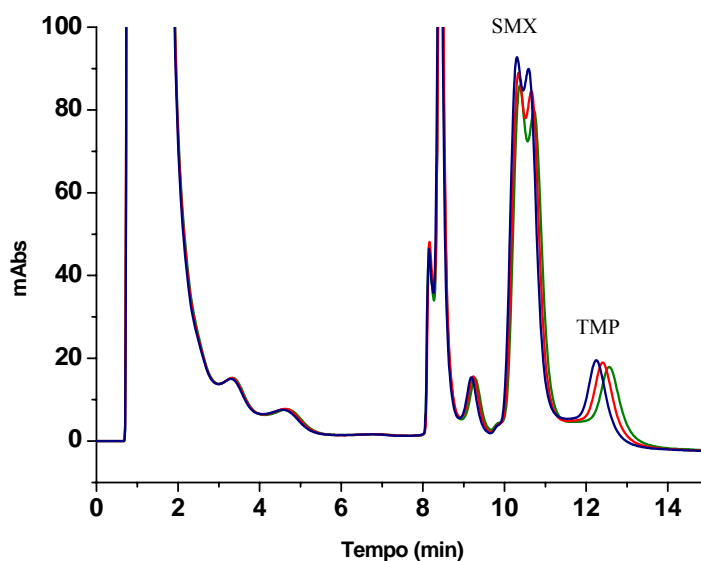


Figura 4. 32 - Cromatogramas das replicatas ($n = 3$) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP ($6 \mu\text{g/mL}$) na coluna RAM C_{18} -BSA ($10 \times 0,46 \text{ cm d.i.}$), utilizando agente de precipitação de proteínas ACN para o preparo das amostras. Condições cromatográficas: 0-5 min solução KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol/L}$ pH 6,0:ACN (98:02 v/v); 5-20 min: solução de KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol/L}$ (pH 6,0):ACN (80:20 v/v); 20-25min: ACN: H_2O (70:30 v/v); volume de injeção de $150 \mu\text{L}$; temperatura 35°C ; $\lambda=269 \text{ nm}$ e vazão $1,0 \text{ mL/min}$.

Embora o uso da solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 mol/L) seja preferido ao uso de ACN, por ser um agente precipitante menos agressivo para o ambiente, sua utilização foi descartada, uma vez que o efeito da matriz não foi eliminado, tendo-se observado, em cada análise, uma maior quantidade de material endógeno, resultando em um aumento gradativo da pressão do sistema cromatográfico.

4.6 Avaliação de agentes de pareamento iônico no controle da ionização dos antibióticos SMX e TMP em amostras de ovo

Solutos ionizáveis são usualmente cromatografados, quando possível, por supressão da ionização. As diferenças físico-químicas entre o SMX e a TMP, associados aos diversos compostos químicos presentes no ovo, justificam a falta de controle de ionização destes fármacos nas análises realizadas.

O pareamento de íons é a alternativa a ser usada, quando o controle de ionização não é obtido por supressão.

Levando em consideração os pKas dos fármacos no pH 6,0 selecionado, ambos estão ionizados: o SMX com carga negativa e a TMP com carga positiva. Portanto, foi considerado um par iônico para SMX, e foi selecionado o tetrabutylamônio (TBA).

O uso de agentes de pareamento iônico no preparo de amostras e não na fase móvel, foi feito com eficiência pelo nosso grupo, na análise de antibióticos ionizáveis.⁶¹

Portanto, após a etapa de centrifugação, volumes de 10 e 20 µL de uma solução 2,0 mmol/L de TBA, foram adicionadas as amostras de ovo fortificadas com SMX e TMP.

A análise dos cromatogramas obtidos mostrou uma melhora na simetria das bandas cromatográficas, mas não na precisão dos tempos de retenção.

O ácido trifluoroacético, outro agente de pareamento iônico, bastante utilizado em análises de peptídeos e de proteínas⁷³, foi então avaliado como fase móvel.

Foram utilizadas, como fases móveis, soluções nas concentrações de 5, 10 e 50 mmol/L contendo a mesma proporção de ACN. Em todos os experimentos realizados controlou-se a temperatura da coluna em 35°C.

A concentração de 5 mmol/L não apresentou resultados satisfatórios, pois os antibióticos continuaram com alterações dos tempos de retenção, a cada análise, e com pobre simetria das bandas cromatográficas (Figura 4.33). O SMX e a TMP, nestas condições, apresentaram tempos de retenção diferentes dos resultados anteriores, pois o pH da solução do TFA 5 mmol/L é 2,5, o que ocasionou a ionização da TMP (hidrofílica) e a neutralização do SMX (hidrofóbico).

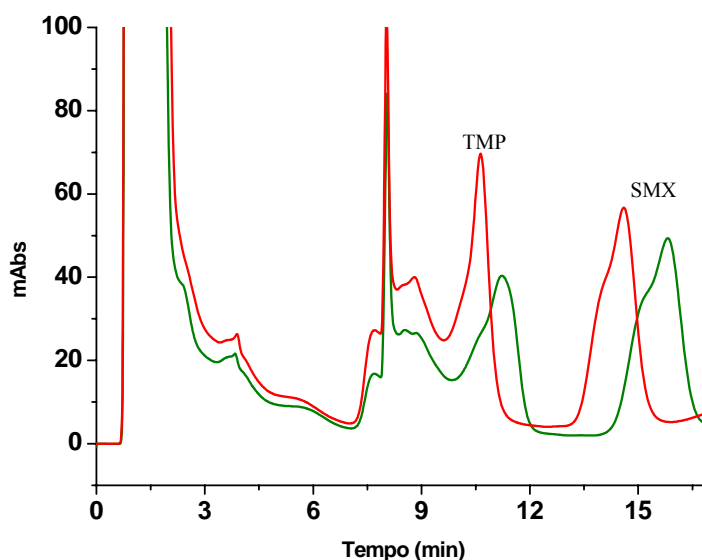


Figura 4.33 - Cromatogramas das replicatas ($n = 2$) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP (6 $\mu\text{g/mL}$), na coluna RAM C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min solução de TFA 5 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 5 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 5 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μL ; temperatura 35°C; $\lambda=269$ nm e vazão 1,0 mL/min.

Utilizando-se a solução de TFA na concentração de 10 mmol/L foi possível controlar a ionização dos antibióticos nas amostras de ovo e esta condição de análise manteve a precisão dos tempos de retenção entre os dias (Figura 4.34).

Como apresentado na página 62, durante as análises foram monitorados os comprimentos de onda 269 e 240 nm. Durante a discussão deste trabalho foram ilustrados cromatogramas de análises, utilizando somente o comprimento de onda de 269 nm, uma vez que não foi verificada entre os dois nenhuma diferença de simetria e largura de banda.

No entanto, nas análises realizadas com o TFA 10 mmol/L, a banda cromatográfica, referente à TMP, apresentou-se larga e assimétrica, quando observada no comprimento de onda de 240 nm. A Figura 4.33 mostra a sobreposição das bandas cromatográficas obtidas nos dois comprimentos de onda.

Sendo assim, a partir desta etapa do trabalho, os cromatogramas serão apresentados com os dois comprimentos de onda monitorados.

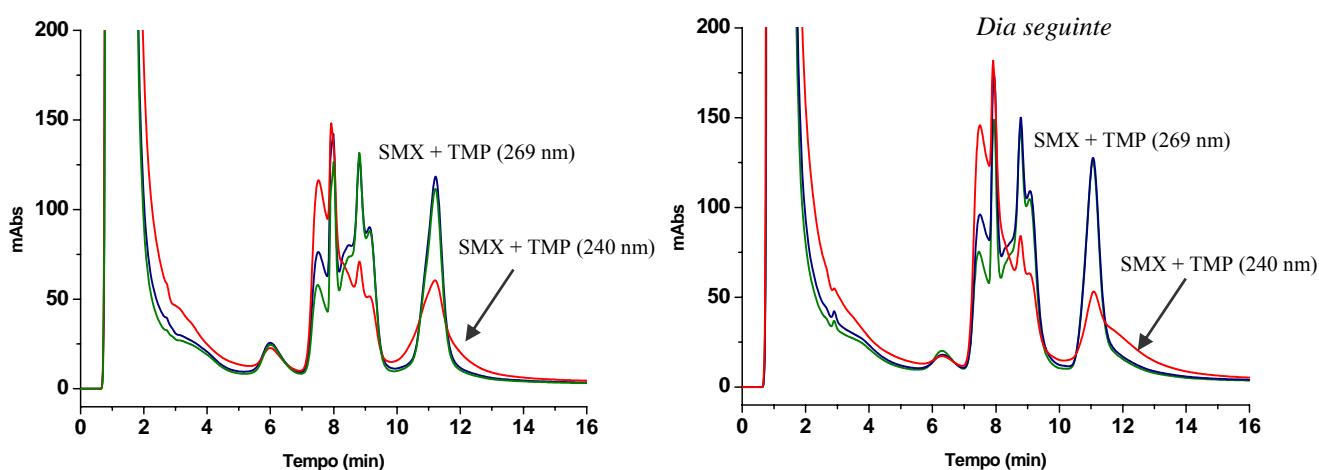


Figura 4.34 - Cromatogramas das replicatas ($n = 2$) de extração das amostras de ovo fortificadas com SMX/TMP ($6 \mu\text{g/mL}$), na coluna RAM C_{18} -BSA ($10 \times 0,46 \text{ cm d.i.}$). Condições cromatográficas: 0-5 min solução de TFA 10 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 10 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 10 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de $150 \mu\text{L}$; temperatura 35°C ; vazão $1,0 \text{ mL/min.}$; $\lambda=240$ e 269 nm .

A coluna RAM C₁₈-BSA foi então acoplada com a coluna analítica C₈-Luna e a mesma fase móvel da extração dos compostos foi utilizada na coluna analítica.

De acordo com o cromatograma da Figura 4.35, foi obtida uma boa resolução, mas a banda cromatográfica referente à TMP continuou larga. Isto já era esperado, uma vez que na coluna RAM C₁₈-BSA a banda cromatográfica da TMP já estava muito alargada, prejudicando, conseqüentemente, a simetria da banda na coluna analítica. Outro problema encontrado foi a baixa retenção para a TMP. Esta baixa retenção prejudicaria na quantificação do composto, pois a banda cromatográfica sofre as interferências das deflexões geradas pela válvula de acoplamento das colunas.

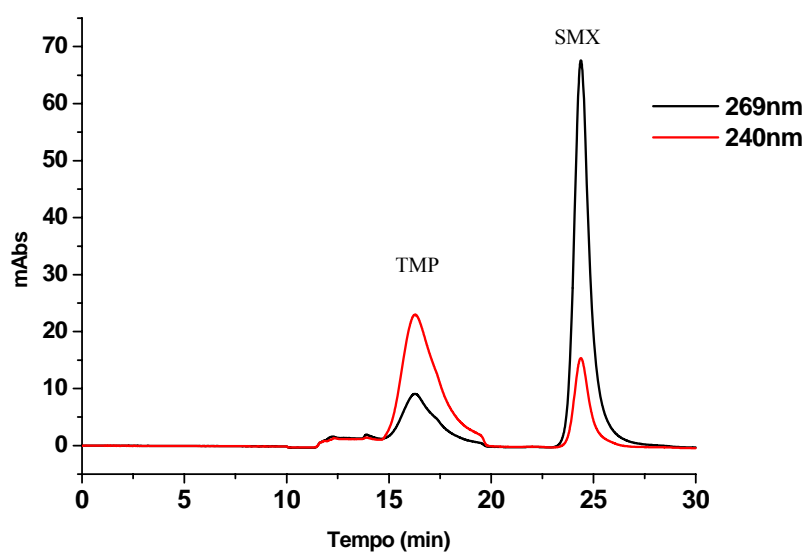


Figura 4 35 - Cromatograma demonstrando a separação dos antibióticos em amostra preparada com ovo (6 µg/mL), com acoplamento das colunas C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C₈ (15 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: Bomba 1: (a) 0-5 min solução de TFA 10 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 10 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 10 mmol/L:ACN (30:70 v/v) e Bomba 2: (d) TFA 10 mmol/L:ACN (80:20 v/v), vazões de 1,0 mL/min, tempo de acoplamento (10,0-15,0 min), volume de injeção 150µL; λ=240 e 269 nm.

Foi considerado um aumento da concentração do TFA para 50 mmol/L, no intuito de afinar a banda cromatográfica da TMP na coluna RAM-BSA. Os resultados foram satisfatórios, uma vez que foram obtidas bandas cromatográficas mais finas, proporcionando um menor tempo de acoplamento (3,7 minutos) (Figura 4.36).

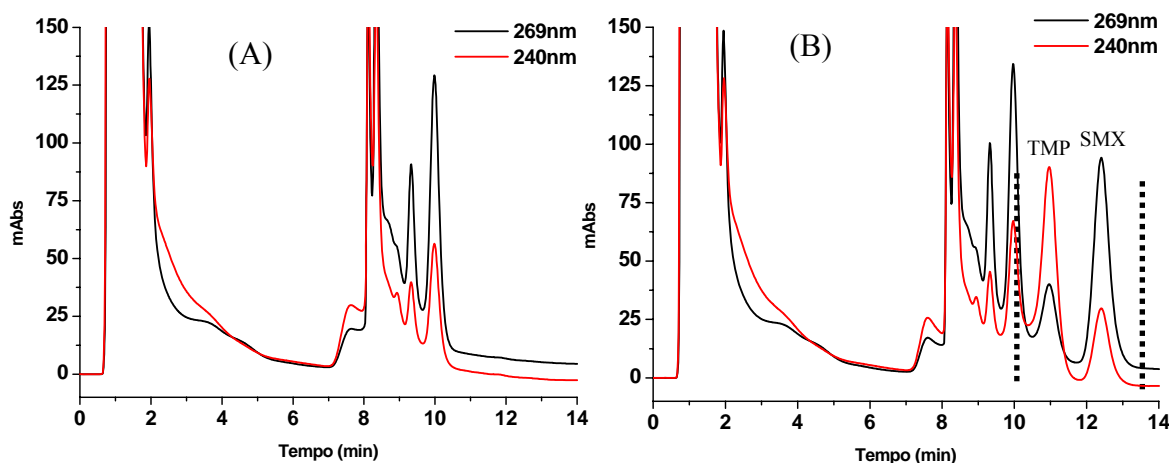


Figura 4. 36 - Cromatogramas de amostras de ovo não fortificada (A) e fortificada com SMX/TMP (6 µg/mL) (B), na coluna RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: solução de TFA 50 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 50 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de 150µL; temperatura 35°C; vazão 1,0 mL/min.; λ=240 e 269 nm.

A fim de avaliar um aumento no tempo de retenção da TMP, foram avaliadas duas colunas analíticas C₈-Luna e C₁₈-Luna. A C₁₈-Luna, foi a coluna selecionada, pois apresentou boa seletividade e adequado tempo de retenção para a TMP (Figura 4. 37).

As condições cromatográficas otimizadas estão descritas na Tabela 4.3 e o volume de injeção foi ajustado para 250 µL, para obter a sensibilidade desejada.

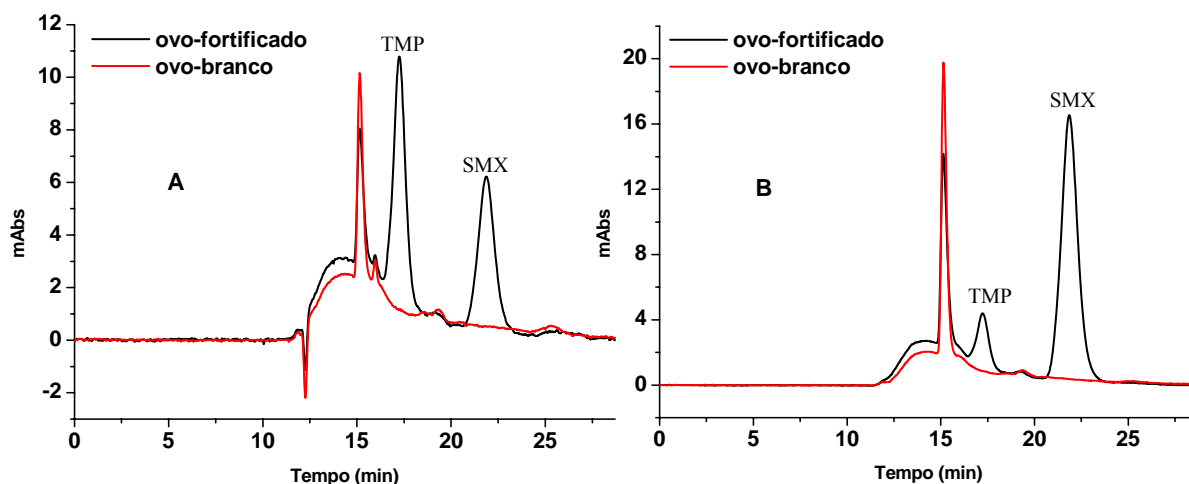


Figura 4.37 - Cromatogramas da análise de amostra fortificada de ovo (1 $\mu\text{g/mL}$ TMP e 2 $\mu\text{g/mL}$ SMX), com acoplamento das colunas C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C_{18} -Luna (15 x 0,46 cm d.i.). **A** - $\lambda = 240$ nm e **B** - $\lambda = 269$ nm.

Tabela 4.3 - Condições cromatográficas utilizadas para a análise de SMX/TMP em amostras de ovos, com o acoplamento das colunas C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i.) e C_{18} -Luna (15 x 0,46 cm d.i.).

Bomba (Eluente)	Tempo (min)	Evento	Posição da válvula ^a
Bomba 1 (eluente A)	0,00-5,00	- Exclusão das macromoléculas pela coluna RAM-BSA	1
Bomba 2 (eluente D)		- Condicionamento da coluna analítica	
Bomba 1 (eluente B)	5,01-10,29	- Extração do SMX e da TMP	
Bomba 1 (eluente B)	10,30-14,00	- Transferência dos analitos para a coluna analítica	2
Bomba 2 (eluente D)		- Descarte	
Bomba 2 (eluente D)	14,01-29,00	- Análise simultânea do SMX/TMP extraídos do ovo	1
Bomba 1 (eluente C)	14,01-19,00	- Limpeza da coluna RAM-BSA	1
Bomba 1 (eluente A)	19,01-29,00	- Re-condicionamento da coluna RAM- BSA para próxima análise	1

Bomba 1: Eluentes: (A) solução de TFA 50 mmol/L, (B) solução TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v), (C) solução de TFA 50 mmol/L:ACN (70:30 v/v); **Bomba 2:** Eluente: (D) TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v). Vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção de 250 μL , λ : 240 e 269 nm e temperatura 35°C. ^a Figura 4.10.

4.7 Validação do método analítico

Com as condições cromatográficas estabelecidas, o método desenvolvido para análise simultânea de SMX e TMP, em amostras de ovos, foi validado de acordo com o protocolo proposto pelo FDA ⁷⁸, consistindo de avaliações de precisão, inter e intradia, exatidão, recuperação, seletividade, limites de quantificação e detecção, além de estudos relacionados à estabilidade da matriz e das amostras em ovo.

A análise dos antibióticos SMX e TMP foi realizada, utilizando-se as condições de fases móveis e eventos, descritas na Tabela 4.3, e usando o sistema cromatográfico exemplificado na Figura 4.10 (p. 58).

Os intervalos de concentração utilizados na construção das curvas de calibração foram estipulados, baseados nos limites máximos residuais (LMRs) do SMX e da TMP em outros alimentos, como, carne e leite, e em estudos de carência destes fármacos em ovos de galinha,^{10, 19, 75-77} uma vez que não há valores descritos de LMR nos órgãos de controle (FDA e diretrizes da União Européia) para estes antibióticos, em ovos.^{10, 11}

As curvas de calibração para o SMX e para a TMP foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 0,080; 0,16; 0,30; 0,60; 1,2; 2,0 e 0,080; 0,12; 0,15; 0,30; 0,60; 1,0 µg/mL para o SMX e TMP, respectivamente. As amostras foram preparadas, em triplicata, em ovo, e foram injetados 250 µL para cada concentração. As curvas analíticas obtidas são mostradas na Figura 4.38.

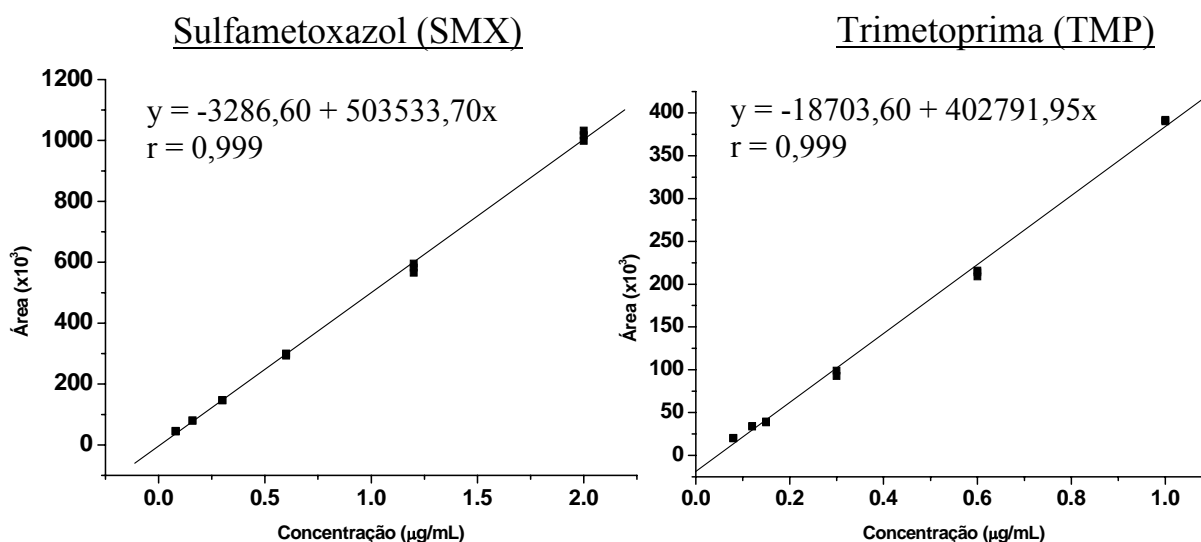


Figura 4. 38 - Curvas de calibração do SMX e da TMP.

Os coeficientes de correlação linear (r) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,98; a precisão expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das triplicatas foi inferior a 15%, e a exatidão apresentou um desvio menor que 15 % do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação, onde o desvio encontrado foi de 20%. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios de aceitação de métodos em fluidos biológicos.⁷⁸

Os estudos referentes à recuperação, precisão intra e interdia e exatidão, foram realizados com amostras controle de qualidade preparadas em quintuplicata, em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração: sulfametoxazol (0,096; 1,00 e 1,80 µg/mL) e trimetoprima (0,096; 0,500 e 0,900 µg/mL).

A precisão e exatidão intra e interdias do método foram determinadas analisando-se cinco replicatas dos três controles de qualidade, em dias não consecutivos. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta da curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas, nas três concentrações examinadas.

Até o segundo dia de análise, o SMX apresentou valores de precisão e a exatidão dentro dos critérios de aceitação do método, com variabilidades menores ou iguais a 15%. No entanto, para a TMP, a precisão apresentou valores aceitos, mas a exatidão mostrou um valor de 73,2%, para o CQ de baixa concentração, ficando fora das normas de aceitação do método.

O valor de exatidão para o CQ baixo foi resultado da perda da eficiência cromatográfica da coluna C₁₈-BSA, causado pelo grande volume de ovo injetado (16 mL). Após este volume, as bandas cromatográficas, na coluna RAM-BSA, ficaram assimétricas e largas, prejudicando a transferência para a coluna analítica.

Devido ao fato dos compostos com alta retenção, e também de material proteico ficarem retidos no topo da coluna, a entrada desta foi invertida para recuperar a performance cromatográfica.

A Figura 4.39 ilustra os cromatogramas obtidos em uma mesma coluna C₁₈-BSA, após a análise de diferentes quantidades de amostras de ovo e após inverter a coluna.

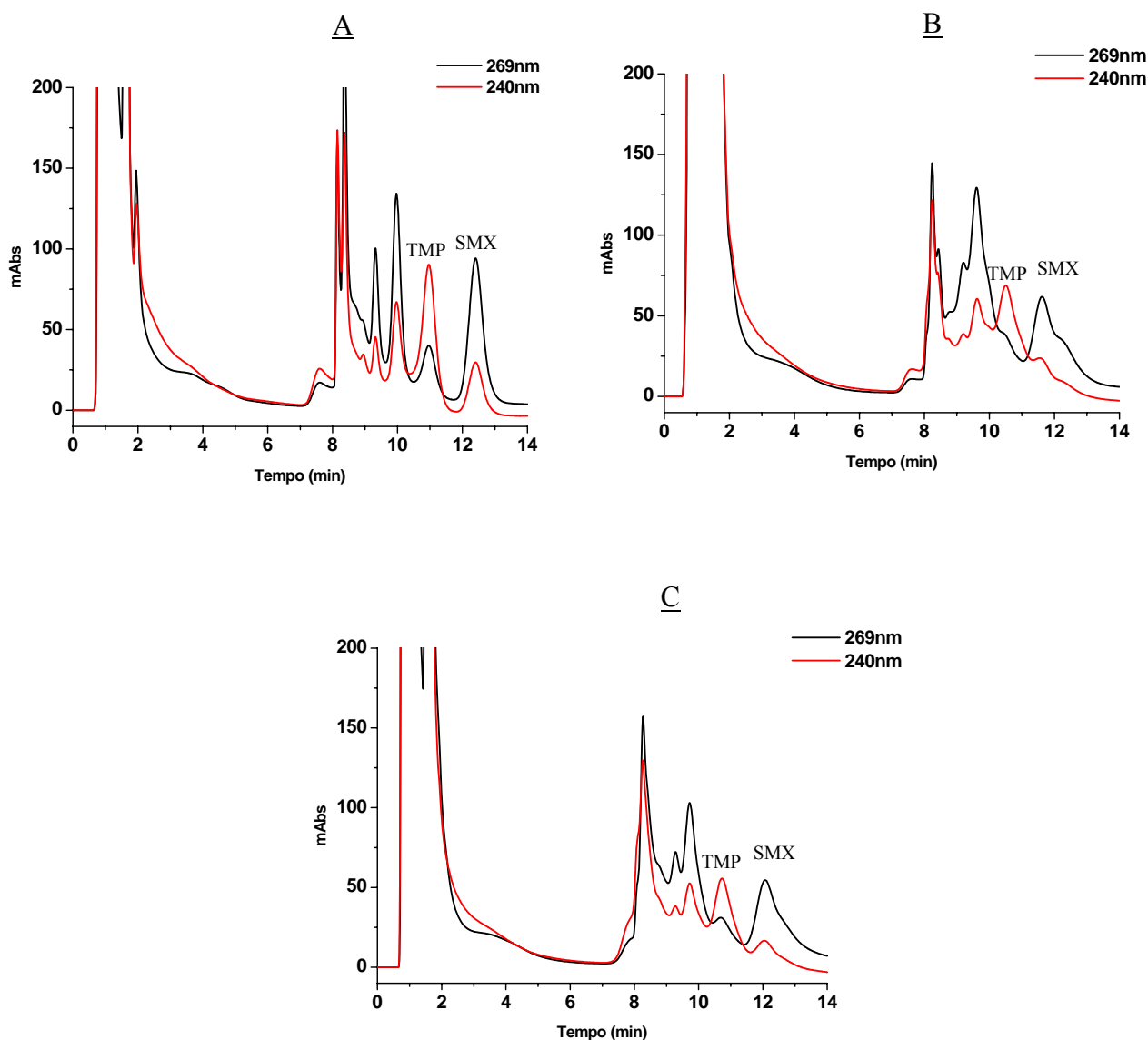


Figura 4. 39 - Cromatogramas ilustrando o desgaste da coluna C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm), após sucessivas injeções de ovo. A - após 10 mL de amostras de ovo; B - após 16 mL de amostras de ovo e C - com a coluna invertida.

Com a coluna C_{18} -BSA invertida, a precisão e exatidão no terceiro dia de análise foram então avaliadas. Valores de exatidão e precisão foram obtidos dentro dos critérios de aceitação do método, tanto para a TMP quanto para o SMX. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4. 4 - Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia para a análise de SMX em amostras de ovo de galinha.

Concentração ^a (µg/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0,096	98,4	2,68	87,1	5,95	93,4	3,09	92,8	3,90
1,00	109	2,20	109	4,14	108	1,32	109	2,55
1,80	108	3,54	112	1,04	111	1,82	110	2,13

^a Concentração teórica**Tabela 4. 5** - Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia para a análise de TMP em amostras de ovo de galinha.

Concentração ^a (µg/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0,096	97,6	2,44	73,2	1,16	85,9	6,57	85,5	3,40
0,500	101	3,65	102	4,49	87,5	2,44	97,0	3,53
0,900	100	5,16	109	3,09	98,5	2,32	103	3,52

^a Concentração teórica

Evidenciando que a coluna extratora estava com baixa eficiência, e também para avaliar a robustez do método, foi preparada uma nova coluna RAM C₁₈-BSA.

A nova coluna RAM C₁₈-BSA reproduziu o tempo de acoplamento de 10,3-14,0 min da coluna antiga (Figura 4.40).

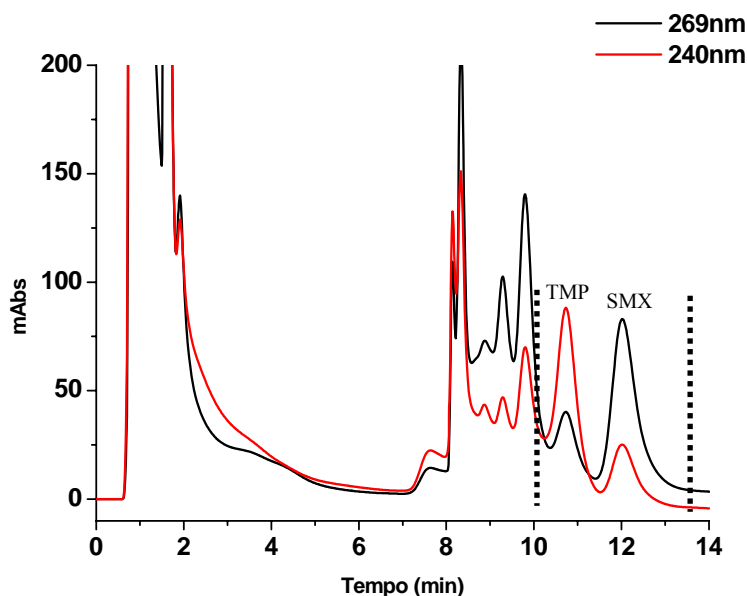


Figura 4 40 - Cromatograma ilustrando a extração de SMX/TMP de amostra fortificada de ovo (6 $\mu\text{g/mL}$), na coluna nova RAM C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i). Condições cromatográficas: 0-5 min: solução de TFA 50 mmol/L; 5-20 min: solução TFA 50 mmol/L:ACN (80:20 v/v); 20-25min: solução de TFA 50 mmol/L:ACN (70:30 v/v); volume de injeção de 150 μL ; temperatura 35°C; vazão 1,0 mL/min.; $\lambda=240$ e 269 nm;

Para verificar a linearidade do método, após a substituição da coluna RAM C₁₈-BSA, foram feitas novas curvas de calibração para o SMX e TMP; desta vez, as amostras foram preparadas sem replicatas de concentração. Foram conseguidos valores superiores a 0,98 (Figura 4. 41) de correlação linear, e assim foi dado prosseguimento a avaliação das figuras de mérito do método.

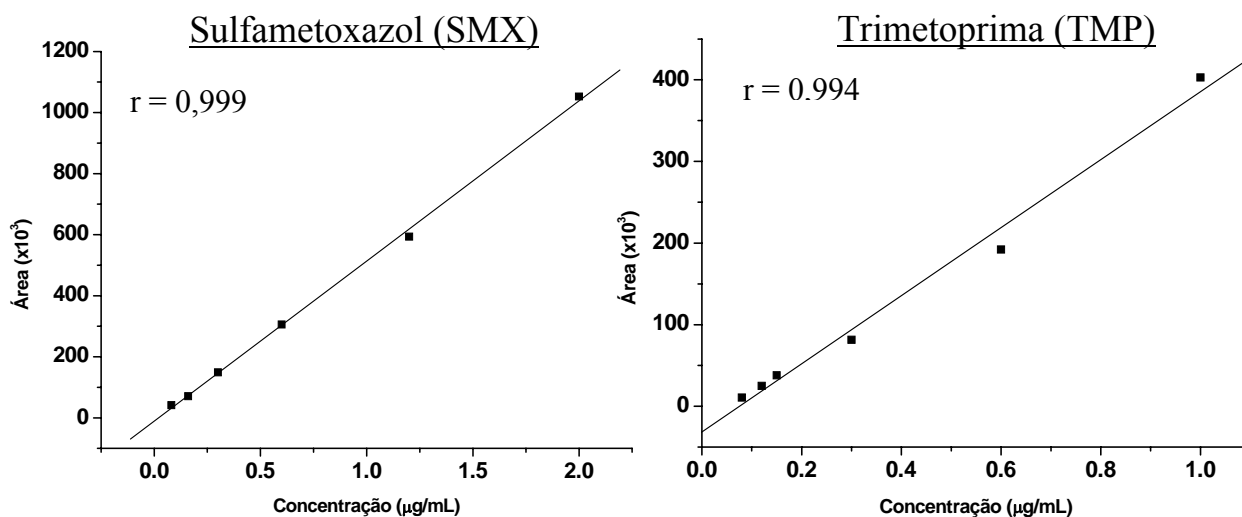


Figura 4. 41 - Curvas de calibração obtidas para o SMX e TMP em amostras de ovo, na nova coluna C_{18} -BSA (10 x 0,46 cm d.i).

Foram realizadas novas avaliações de precisão e exatidão das amostras de controle de qualidade, uma vez que foi encontrada baixa exatidão para a amostra de CQ baixo da TMP, no segundo dia de análise. A Tabela 4.6 mostra os valores obtidos.

Tabela 4. 6 - Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdia para análise em amostras de ovo fortificado com SMX (A) e TMP (B).

	Concentração ^a (µg/mL)	4º dia (n=5)			Concentração ^a (µg/mL)	4º dia (n=5)	
		Exatidão (%)	CV (%)			Exatidão (%)	CV (%)
(A)	0,096	103	7,00	(B)	0,096	106	3,02
	0,500	109	2,06		1,00	112	1,76
	1,00	111	2,77		1,80	110	2,58

^a Concentração teórica

^a Concentração teórica

A eficiência de extração para os antibióticos foi avaliada com os três controles de qualidade e foi calculada pela razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras de ovo fortificadas no início do pré-tratamento com as áreas das amostras fortificadas após o processo de pré-tratamento.

Os valores obtidos mostraram que a coluna extratora (RAM-BSA) é eficiente para a extração do SMX e da TMP e demonstra também que os

processos utilizados no pré-tratamento das amostras, precipitação de proteínas e centrifugação, não afetam a recuperação dos compostos (Tabela 4.7).

Tabela 4. 7 - Eficiência de extração obtida para as amostras de CQ do sulfametoxazol e trimetoprima (n=5)

SMX ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	TMP ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
0,096	104	0,096	104
1,00	112	0,500	101
1,80	112	0,900	117

O critério de aceitação para o limite de quantificação foi que a precisão e a exatidão de três amostras extraídas não ultrapassassem o valor de 20 % de variabilidade, enquanto que o limite de detecção foi calculado, obtendo-se um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

Os valores de limite de quantificação obtidos foram de 0,080 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os antibióticos, e os valores de limite de detecção de 0,025 e 0,040 $\mu\text{g/mL}$ para o SMX e TMP, respectivamente.

A exatidão do método foi também avaliada pela análise de duas amostras de concentrações desconhecidas ao analista, chamada de teste cego. Os resultados obtidos estão dentro das normas de aceitação do método, precisão e exatidão inferiores à variação de 15%, e estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4. 8 - Precisão e exatidão obtidas no teste cego de SMX/TMP em amostras de ovo (n=3).

Analito ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV) (%)	Exatidão (%)
SMX			
Amostra 1	0,320	5,21	101
Amostra 2	1,08	0,900	108
TMP			
Amostra 1	0,160	7,05	86,8
Amostra 2	0,540	4,95	99,2

4.7.1 Estabilidade das amostras

Para avaliar a estabilidade das amostras de ovo foi necessário o preparo de outra coluna RAM C₁₈-BSA, uma vez que a última coluna já estava com um volume de 14 mL de ovo injetado, e podia apresentar, durante os testes, os mesmos problemas anteriormente citados (Figura 4.39).

Foram avaliadas novas curvas de calibração e foram obtidos valores acima de 0,98 para os coeficientes de correlação linear (r), demonstrando a linearidade e robustez do método quando da substituição da coluna extratora (Figura 4.42).

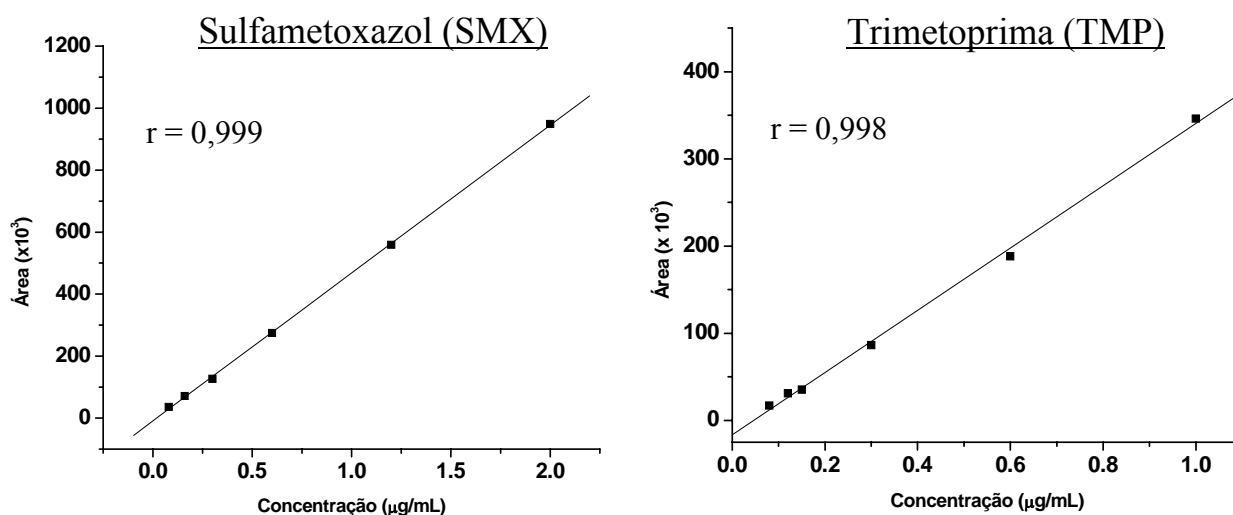


Figura 4. 42 - Curvas de calibração obtidas para o SMX e TMP em amostras de ovo, na coluna C₁₈-BSA (10 x 0,46 cm d.i).

As estabilidades do SMX e da TMP em amostras de ovo e da matriz biológica foram verificadas em diferentes condições: amostras submetidas a ciclos de gelo e degelo; congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; durante os tempos de manipulação das amostras e de permanência em auto-injetor.

Para a realização dos testes de estabilidade, foram utilizadas amostras preparadas nas concentrações dos controles de qualidade, conforme descrito anteriormente. Os fármacos foram considerados estáveis na matriz biológica e em solução, quando foram observadas variações inferiores a 15 % com relação às concentrações iniciais.

4.7.1.1 Estabilidade em ciclos de gelo e degelo

As amostras de ovo fortificadas com SMX e TMP foram preparadas nas três concentrações CQ e analisadas imediatamente antes de serem congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tempo zero). Nos tempos especificados (24, 48 e 72 horas), as amostras foram degeladas e analisadas a temperatura ambiente. As Tabelas 4.9 e 4.10 apresentam os valores percentuais de precisão e exatidão de estabilidade para as replicatas de injeção ($n = 3$) para os três ciclos de degelo. Os

valores de exatidão (%) foram obtidos, calculando-se a razão entre as concentrações obtidas nos tempos de degelo e do tempo zero.

Tabela 4. 9 - Resultados do estudo de estabilidade do SMX em amostras de ovo, nos ciclos de gelo e degelo.

Concentração (µg/mL)	Tempo Zero		1º Ciclo		2º Ciclo		3º Ciclo	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,096	2,84	108	1,36	105	0,670	106	1,13	100
1,00	9,97	107	0,340	111	0,270	109	0,720	105
1,80	0,860	114	1,01	103	0,860	101	1,78	98,0

Tabela 4 10 - Resultados do estudo de estabilidade da TMP em amostras de ovo, nos ciclos de gelo e degelo.

Concentração (µg/mL)	Tempo Zero		1º Ciclo		2º Ciclo		3º Ciclo	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,096	0,580	106	6,07	114	5,46	100	13,1	103
0,500	10,6	99,7	2,77	114	0,720	102	2,92	103
0,900	0,830	102	0,780	111	0,970	95,8	6,94	102

Os resultados obtidos em todos os tempos de degelo mostraram coeficientes de variação entre 0,270-1,78 % e 0,720-13,1 % para o SMX, e para TMP, respectivamente. Os valores de exatidão variaram entre 98,2 -111 % e 95,8-114 % para o SMX e TMP, respectivamente. Estes valores evidenciam que os dois antibióticos permaneceram estáveis nas condições de estudo. Paralelamente, observou-se que a matriz biológica permaneceu estável nestas

condições, sem qualquer ocorrência de interferência originada pela degradação do ovo.

4.7.1.2 Estabilidade de longa duração

O estudo da estabilidade de longa duração tem como objetivo estabelecer o tempo máximo em que amostras podem permanecer armazenadas, após a coleta, antes de serem analisadas.

Da mesma forma, as amostras, nas concentrações controle, foram analisadas imediatamente após a preparação (tempo zero) e armazenadas a -20 °C. As amostras armazenadas foram degeladas uma única vez e analisadas nos seguintes tempos: 24, 48 e 72 horas, e após 60 dias. Todos os resultados obtidos foram calculados por interpolação na curva de calibração e comparados com os obtidos das amostras analisadas no tempo zero, para obter o valor de exatidão.

As amostras contendo SMX e TMP apresentaram-se estáveis em todas as condições de estudo realizadas com valores de exatidão abaixo de 15% (Tabela 4.11 e 4.12). Amostras de ovo não fortificadas também foram analisadas paralelamente, nas condições descritas, e mostraram-se igualmente estáveis.

Tabela 4. 11 - Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de ovo, fortificadas com SMX, armazenadas a -20°C.

Concentração (µg/mL)	Tempo Zero		24 h		48 h		72 h	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
0,096	2,84	108	1,36	105	8,57	95,7	1,33	104
1,00	9,97	107	0,340	111	3,69	105	0,410	105
1,80	0,860	115	1,01	103	3,63	97,4	2,55	99,3

Tabela 4. 12 - Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de ovo fortificadas com TMP, armazenadas a -20°C.

Concentração (µg/mL)	Tempo Zero		24 h		48 h		72h	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
0,096	0,580	106	6,07	114	5,60	88,5	9,61	108
0,500	10,6	99,7	2,77	114	4,71	91,9	3,03	110
0,900	0,830	103	0,780	111	4,25	88,5	2,22	107

4.7.1.3 Estabilidade de curta duração

No teste de estabilidade de curta duração, as amostras permaneceram à temperatura ambiente durante um período correspondente ao tempo de preparo e manipulação das mesmas. O tempo médio de preparação de uma amostra de ovo, considerando-se o tempo necessário para a centrifugação (10 minutos), é de cerca de 30 minutos. As amostras foram preparadas nas concentrações do controle de qualidade, analisadas imediatamente, e deixadas em repouso, à temperatura ambiente, durante um período de quatro horas antes da análise subsequente. Como esperado, considerando-se os resultados anteriores, as amostras permaneceram estáveis durante este período, com coeficientes de variação inferiores a 15 % e exatidão dentro dos limites de aceitação do método.

A estabilidade das amostras, durante a permanência no auto-injetor, foi avaliada durante um período de 10 h, que foi o tempo necessário para a realização da curva de calibração. Tanto as amostras, como a matriz (branco), permaneceram estáveis no auto-injetor durante o período necessário para o desenvolvimento da curva analítica.

4.7.1.4 Estabilidade em solução

A estabilidade em solução metanólica dos antibióticos SMX e TMP não foi avaliada, uma vez que o estudo realizado no grupo⁶⁴ demonstrou uma estabilidade das amostras em solução de 2 meses.

Conclusões

"A fé não é algo para se entender, é um estado para se transformar."

Mahatma Gandhi

5. Conclusões

As colunas RAM-BSA mostraram-se eficazes para a exclusão das proteínas do ovo, com um percentual médio de 95 %, utilizando-se apenas água como fase móvel. As colunas RAM-BSA usadas são de fácil preparo, robustas e eficientes para serem usadas como colunas extratoras para os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima, em amostras de ovo.

Para prolongar a vida útil das colunas RAM-BSA, foi necessário à utilização de um agente de precipitação de proteínas, e dentre os agentes precipitantes avaliados, a ACN mostrou-se mais eficiente na precipitação das proteínas, em relação à solução de sulfato de amônio, permitindo a obtenção de um sobrenadante mais limpo e menos prejudicial às colunas RAM-BSA.

Foram avaliadas colunas RAM-BSA de 5 e 10 cm de comprimento e ambas as colunas apresentaram falta de precisão nos tempos de retenção para as condições cromatográficas utilizadas

Foram avaliadas diversas condições cromatográficas, com a finalidade de diminuir a influência da matriz na análise dos antibióticos; o ácido trifluoro acético (TFA), na concentração de 50 mmol/L, dentre as fases móveis testadas, foi o único a possibilitar o desenvolvimento do método para análise simultânea do SMX e TMP em amostras de ovos de galinha. Foi obtido um tempo ideal de acoplamento, e a coluna analítica C₁₈ foi a que apresentou a melhor resolução e simetria das bandas cromatográficas para os antibióticos.

A Cromatografia Multidimensional é uma técnica que permite a análise de amostras com alto grau de complexidade, e o seu uso demanda um tempo inicial para a determinação das condições de análise e do acoplamento entre as colunas, mas após terem sido encontradas essas condições, o método desenvolvido se torna muito prático. O emprego dessa técnica possibilitou o desenvolvimento do método de análise simultânea do SMX e TMP em amostras de ovos.

O método desenvolvido mostrou-se prático, linear, exato, seletivo, robusto e sensível, empregando apenas um simples pré-tratamento “off line”, reduzindo a manipulação da amostra e o tempo total de análise, em relação aos outros métodos até então apresentados na literatura.^{24, 52-55, 59}

O trabalho desenvolvido demonstrou que as colunas RAM-BSA preparadas foram eficientes para a extração da SMX/TMP, em amostras de ovos, inferindo que elas podem também ser utilizadas para outras classes de compostos nesta matriz complexa.

Referências

Bibliográficas

*"Se você não aprende a rir das dificuldades,
você não terá nada para rir quando estiver
velho."*

Edgar Watson Howe

6. Referências Bibliográficas

1. HOLLAND, B., WELCH, A. A., UNWIN, I. D., BRESS, D. H., PAULA, A., SOUTHGATE, D.A.T. "McCance and Widdowson's the composition of foods". *Royal Society of Chemistry*. 5^a ed., Cambridge, 1991, 462p.
2. BERTECHINI, A. B. "Mitos e Verdades Sobre o Ovo de Consumo" *Trabalho publicado em Anais da Conferencia APINCO 2003*, pág. 19.
3. UBA. "União Brasileira de Avicultura. Orçamento 2005/2006". Disponível <<http://www.uba.org.br>>. Acesso em: 6 jan. de 2007.
4. IBGE. "Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística". Disponível <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 dez. 2006.
5. AERTS, M. M. L., HOGENBOOM, A. C., BRINKMAN, U.A.Th. "Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products". *J. Chromatogr.B*, **667**: 1-40, 1995.
6. STOLKER, A.A.M., BRINKMAN, U.A.Th. "Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review". *J. Chromatogr.A*, **1067**: 15-53, 2005.
7. MIDIO, A. F., MARTINS, D. I. *Toxicologia de Alimentos*. Livraria Varela, São Paulo, SP, 1999.
8. NOLLET, L. M. L. *Food Analysis by HPLC*. 2^a ed. New York, Marcel Dekker, 2000, p.659.
9. BALIZS, G., HEWITT A. "Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry". *Anal. Chim. Acta.*, **492**: 105-131, 2003.
10. OFFICIAL JOURNAL OF EUROPEAN COMMUNITIES. Council Regulation (EEC) n° 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (OJ n° L 224, 18.8.1990), Annex I., 2002, 29 p. Disponível em: <<http://cemu10.fmv.ulg.ac.be/ostc/902377/902377reg.html>>. Acesso em: abril 2005.

11. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry. Evaluating the Safety of Antimicrobial New Animal Drugs with Regard to Their Microbiological Effects on Bacteria of Human Health Concern. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Veterinary Medicine, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cvm/guidance>>. Acesso em: 25 Fev. 2006.
12. GOODMAN, L. S., GILMAN, A. *The Pharmacology Basis of Therapeutics*. 5th ed., New York, Macmillan Publishing CO., INC, 1975, p.1113.
13. BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal*. Porto Alegre, Artmed, 2001.
14. SILVA, P. *Farmacologia*. 6^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.
15. CATES, L. A. "Sulfa Drugs". IN: *Handbook of Chemotherapeutic Agents*, v.1, M. VERDERAME (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1986.
16. BATZIAS, G. C., BOTSOGLOU, N. A., KOTSAKI-KOVATSI, V. P., KOUNENIS, G. "New simple liquid chromatographic method for the determination of trimethoprim, sulfadiazine and N4-acetylsulfadiazine in plasma of broilers" *J. Chromatogr. B*, **769**: 253-259, 2002.
17. KOROLKOVAS, A., BURCHWALTER, J. H. *Química Farmacêutica*. 1^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1988.
18. BRODY, T. M., LARNER, J., MINNEMAN, K. P., NEU, H. C. *Farmacologia Humana*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997.
19. KAN, C. A., PETZ, M. "Residues of Veterinary Drugs in Eggs and Their Distribution between Yolk and White". *J. Agric. Food. Chem.*, **48**: 6397-6403, 2000.
20. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. & JARDIM, I. C. S. F. "Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica". *Química Nova*, **24**(1): 68-76, 2001.
21. ANDERSON, J. A. "High performance liquid chromatography (direct injection techniques)". *Clin. Chem.*, **65**: 434-443, 1993.
22. HENNION, M. C. "Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography" *J. Chromatogr. A*, **856**: 3-54, 1999.

23. DUBOIS, M., FLUCHARD, D., SIOR, E., DELAHAUT, PH. "Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry" *J. Chromatogr.B*, **753**: 189-202, 2001.
24. HELLER, D. N., NGOH, M. A., DONOUGHUE, D., PODHORNIAK, L., RIGHTER, H., THOMAS, M. H. "Identification of incurred sulfonamides residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography- tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection" *J. Chromatogr.B*, **774**: 39-52, 2002.
25. PENSABENE, J. W., FIDDLER, W., PARKS, O. W. "Isolation of Sulfonamides from Whole Egg by Supercritical Fluid Extraction" *J. Chromatogr. Sci.*, **35**: 270-274, 1997.
26. BARKER, S. A. "Matrix solid-phase dispersion" *J. Chromatogr. A*, **885**: 115-127, 2000.
27. SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, J. L. "Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis" *J. Chromatogr.B*, **801**: 141-156, 2004.
28. MULLET, W. M. "Determination of drugs in biological fluids by direct injection of sample for liquid-chromatographic analysis" *J. Biochem. Biophys Methods*, **70**: 263-273, 2007.
29. QUINN, H. M., TAKAREWSKI, J. J. "High Performance Liquid Chromatography Methods and Apparatus" *PCT Int. Appl. WO 9716724*, 1997, p.46.
30. CASSIANO, N. M., LIMA, V. V., OLIVEIRA, R. V., DE PIETR, A. C., CASS, Q. B. "Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography" *Anal. Bioanal. Chem.* **304**: 1462-1469, 2006.
31. BOOS, K. S., RUDOLPHI, A. "The use of restricted-access media in HPLC, parti II-Applications" *LC-GC*, **15**:816-823, 1997.
32. HAGINAKA, J. "Drug determination in serum by liquid chromatography with restricted access stationary phases" *Trends Anal. Chem.*, **10**:17-22, 1991.

33. GISCH, D.J.; HUNTER, B.T. & FEIBUSH, B. "Shielded Hydrophobic Phase: A New Concept for Direct Injection Analysis of Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography". *J. Chromatogr.*, **433**, 264-268, 1988.
34. HAGINAKA, J.; WAKAI, J. & YASUDA, H. "Synthesis of Mixed-Functional-Phase Silica Supports for Liquid Chromatography and their Applications to Assays of Drugs in Serum". *J. Chromatogr.*, **535**: 163-172, 1990.
35. HAGINAKA, J. & WAKAI, J. "Preparation and Characterization of Mixed Functional Phase Silica Materials Using Phenyl-, Butyl- or Octylchlorosilane as a Silylating Agent". *J. Chromatogr.*, **596**: 151-156, 1992.
36. HAGESTAM, H. & PINKERTON, T. C. "Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography" *Anal. Chem.*, **57**: 1757-1763, 1985.
37. PERRY, J.A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T.J. & RATEIKE, J.D. "An Improved Internal-Surface Reversed-Phase" *J. Liq. Chromatogr.*, **15**: 3343-3352, 1992.
38. BOOS, K. S.; RUDOPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A. & LUBDA, D. "Alkyl-diol silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **352**: 684-690, 1995.
39. RBEIDA, O., CHRISTIAENS, B., HUBERT, PH., LUBDA, D., BOOS, K. S., CROMMEN, J., CHIAP, P. "Evaluation of a novel anion-exchange restricted-access sorbent for on-line sample clean-up prior to the determination of acidic compounds in plasma by liquid chromatography" *J. Chromatogr. A*, **1030**: 95-102, 2004.
40. DESILETS, C.P.; ROUNDS, M.A. & REGNIER, F.E. "Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, **544**: 25-39, 1991.
41. GLUNZ, I.J.; PERRY, J.A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T.J.; Rateike, J.D. & Glunz, P.W. "The Semipermeable Surface, A New Restricted Access Medium" *J. Chromatogr.*, **15**: 1361-1379, 1992.

42. YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N. & IMAI, H. "Some Characteristics of a Protein-Coated ODS Column and its Use for the Determination of Drugs by the Direct Injection Analysis of Plasma Samples". *Chromatographia*, **19**: 466-472, 1984.
43. MENEZES, M.L. & FELIX, G. "Analysis of Organochlorine Pesticides in Plain Milk Using Direct Injection on a ISRP Column with Column Switching". *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **19**: 3221-3228, 1996.
44. MENEZES, M.L. & FELIX, G. "On-Line Extration and Separation of Bendiocarb, Methomyl, Methylparathion and Pentachlorophenol Pesticides from Raw Milk". *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **21**: 2863-2871, 1998.
45. MENEZES, M.L.; FELIX, G. & DEMARCHI, A.C.C.O. "On-Line Extration and Determination of Carbofuran in Raw Milk by Direct HPLC Injection on a ISRP Column". *Chromatographia*, **47**: 81-83, 1998.
46. ODA, Y.; ASAKAWA, N.; ABE, S.; YOSHIDA, Y. & SATO, T. "Avidin Protein-Conjugated Column for Direct Injection Analysis of Drug Enantiomers in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography". *J. Chromatogr.*, **572**: 133-141, 1991.
47. FELIX, G., CAMPESE, D. "Determination by HPLC of the chiral conversion of drugs in biologic fluids on new RAM-CHIRAL columns" *30th Internacional Symposium & Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations and Related techniques*. San Francisco-CA-USA, 2006, p.170.
48. SANBE, H., HAGINAKA, J. "Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of β -blockers in biological fluids" *The Analyst*, **128**: 593 -597, 2003.
49. KISHIDA, K. "Restrictred-access media liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N4- acetyl metabolites in eggs" *Food Chemistry*, **101**: 281-285, 2007.
50. AGARWAL, V. "High performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in tissue, milk and egg" *J. Chromatogr.*, **624**: 411- 423, 1992
51. HERNANDEZ-ARTESEROS, J. A., BARBOSA, J., COMPANO, R., PRAT, M. D. "Analysis of quinolone residues in edible animal products" *J. Chromatogr.A*, **945**: 1-24, 2002.

52. ATTA, A. H., EL-ZEINI, S. A. "Depletion of trimethoprim and sulphadiazine from eggs of laying hens receiving trimethoprim/sulphadiazine combination" *Food Control*, **12**: 269-274, 2001.
53. CAVALIERE, C., CURINI, R., DI CORCIA, A., NAZZARI, M., SAMPERI, R. "A Simple and Sensitive Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Confirmatory Method for Analyzing Sulfonamide Antibacterials in Milk and Egg" *J. Agric. Food. Chem.*, **51**: 558-566, 2003.
54. CAVALIERE, C., CURINI, R., DI CORCIA, A., NAZZARI, M., POLCI, M. L. "Rapid Confirmatory Assay for Determining 12 Sulfonamide Antimicrobials in Milk and Eggs by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry" *J. Agric. Food. Chem.*, **51**: 4225-4232, 2003.
55. TARBIN, J. A., CLARKE, P., SHEARER, G. "Screening of sulfonamides in eggs using gas chromatography-mass selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry" *J. Chromatogr.B*, **729**: 127-138, 1999.
56. BOGIALLI, S., CURINI, R., DI CORCIA, A., NAZZARI, M., POLCI, M. L. "Rapid Confirmatory Assay for Determining 12 Sulfonamide Antimicrobials in Milk and Eggs by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry" *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 4224-4232, 2003.
57. KISHIDA, K., FURUSAWA, N. "Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxy/N4-acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues, and eggs" *Talanta*, **67**: 54-58, 2005.
58. FURUSAWA, N., "Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents" *Analytica Chimica Acta*, **481**: 255-259, 2003.
59. SCHUCH, R., SCHWAIGER, I. "HPLC-Determination of trimethoprim in milk, poultry tissue, eggs and fish with simultaneous UV and fluorescence detection" *Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung und -forschung*, **24**: 413-416, 2000.
60. BRADFORD, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254, 1976.

61. CASS, Q. B., GOMES, R. F., CALAFATTI, S. A., PEDRAZOLLI Jr, J. "Determination of amoxycillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr. A*, **987**: 235-241, 2003.
62. CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G., CASSIANO, N. M., PEDRAZOLLI, J. Jr. "Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr. B*, **766**: 153-160, 2001.
63. CASSIANO, N. M; CASS, Q. B.; DEGANI, A L. G.; WAINER, I. W. "Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography". *Chirality*, **14**: 731-735, 2002.
64. PEREIRA, A. V., CASS, Q. B. "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean up column" *J. Chromatogr. B*, **826**, 139-146, 2005.
65. CASS, Q. B., OLIVEIRA, R. V. "Evaluation of Liquid Chromatographic Behavior of Cephalosporinics Antibiotics Using Restricted Access Medium Columns for On-line Sample Cleanun of Bovine Milk" *J. Agric. Food. Chem.*, **54**: 1180-1187, 2005.
66. OLIVEIRA, R. V., DE PIETRO, A. C., CASS, Q. B. "Quantification of cephalixin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup" *Talanta*, **71** (3): 1233-1238, 2007.
67. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. "Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes". *Quim. Nova*, **21**(6): 787-793, 1998.
68. OLIVEIRA, R. V. *Métodos para a Análise de Antibióticos Cefalosporínicos em Leite Bovino, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Multidimensional, com Injeção Direta de Amostras*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 59 p.
69. YU, Z.; WESTERLUND, D. & BOOS, K. "Evaluation of liquid chromatographic behavior of restrited-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems". *J. Chromatogr. B*, **704**: 53-62, 1997.

70. LIMA, V. V., CASSIANO, N. M., CASS, Q. B. “Desenvolvimento de Colunas Cromatográficas de Meios de Acesso Restrito Proteína-Imobilizada e suas Aplicações para Análise de Fármacos com Injeção Direta de Plasma Humano” *Química Nova*, **29**: 72-78, 2006.
71. CLAESSENS, H. A.; STRATEN, M. A. van; KIRKLAND, J. J. “Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography”. *J. Chromatogr. A*, **728**: 259-270, 1996.
72. GALATTI, T. F. *Um Ensaio para a Quantificação Enantiosseletiva do Modafinil e seus Metabólicos em Plasma Humano por Injeção Direta de Amostras usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Acoplamento Aquiral-Quiral de Colunas*. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química-UFSCar, 2004. Dissertação de Mestrado, 77 p.
73. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. 2^a ed., Nova Iorque, John Wiley & Sons Inc., 1997, p. 1-765.
74. MENGELERS, M. J. B., OORPRONG, M. B. .M., KUIPER, H. A., AERTS, M. M. L., VAN GOGH, E. R., VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. “Determination of sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, trimethoprim and their main metabolites in porcine plasma by column switching HPLC” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**: 1765-1776, 1989.
75. ROUDAUT, B., GARNIER, M. “Sulphonamide residues in eggs following drug administration via the drinking water” *Food Additives and Contaminants*, **19**: 373-378, 2002.
76. FURUSAWA, N., KISHIDA, K. “Transfer and distribution profiles of dietary sulphonamides in the tissues of laying hen” *Food Additives and Contaminants*, **19**: 368-372, 2002.
77. NAGATA, T., SAEKI, M., IIDA, T., KATAOKA, M., SHIKANO, S. “High Performance Liquid Chromatographic Determination of Trimethoprim Residues in Egg Yolk and Albumen in a Feeding Experiment” *British Veterinary Journal*, **147**: 346-351, 1991.
78. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human

Services, Center for Veterinary Medicine, 2001, 22 p. Disponível em :
<<http://www.fda.gov./cder/guidance/4252fnp.pdf>>. Acesso em: 22Agost. 2006.

79. RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F.,
MELLO, L. F. C. “Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos”
Quim. Nova, **27**: 771-780, 2004.