

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE DE RESÍDUOS DE SULFONAMIDAS EM ALIMENTOS POR
ELETROFORESE CAPILAR E ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Rodrigo Hoff

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Tarso Benigno Ledur Kist

Porto Alegre, agosto de 2008.

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida em duas etapas. A primeira delas, envolvendo eletroforese capilar, foi executada no Laboratório de Desenvolvimento de Métodos, do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A fase de desenvolvimento de métodos extrativos e análises por espectrometria de massas foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário de Porto Alegre – LANAGRO/RS, órgão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O mestrando conciliou o desenvolvimento deste trabalho com suas atividades como analista e, desde novembro de 2007, como responsável técnico pelo Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos – LRPM – do LANAGRO/RS.

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de coletas realizadas pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dentro das atividades rotineiras do Plano Nacional de Controle de Resíduos.

Dedico este trabalho àqueles que se entregam à espinhosa tarefa de desenvolver pesquisa científica no Brasil. Dedico igualmente à minha família e amigos, que sempre me apoiaram e com os quais sempre pude contar.

Especialmente dedico aos meus filhos, João Vitor e Gabriel e à minha amada Caren, aos quais neguei em muitos momentos o convívio e a merecida atenção em prol deste trabalho.

Agradecimentos

Ao orientador e amigo Dr. Tarso B. L. Kist.

À Comissão de acompanhamento Dr. Carlos Termignoni e Dr. Giancarlo Pasquali.

Aos colegas do Laboratório de Métodos, em especial a Gabriel Rübensam, Ana Paula Vieira e Paulo Trenhago.

Aos colegas do LANAGRO/RS, em especial a Luciane Hauschild, Beatris Kuchenbecker, Fabiano Barreto, Cristina Ribeiro, Adir Velho Martins, Soraya Marredo, Carlos Eugênio Soto Vidal, Elton Massarolo, Suzana Fonseca e Jessica Melo.

À Coordenação e Administração do LANAGRO/RS, em especial a João Mathias Becker, Aguinaldo Parussolo e João Vianna de Freitas.

Índice Remissivo

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1. Índice de figuras..... | página 07 |
| 2. Índice de tabelas..... | página 08 |
| 3. Lista de abreviaturas e símbolos..... | página 09 |
| 4. Resumo..... | página 10 |
| 5. Introdução geral..... | página 14 |
| 5.1. Histórico..... | página 15 |
| 5.2. Mecanismo de ação..... | página 16 |
| 5.3. Mecanismo de resistência bacteriana às sulfonamidas..... | página 19 |
| 5.4. Propriedades físico-químicas das sulfonamidas..... | página 20 |
| 5.5. Propriedades farmacológicas da sulfonamidas..... | página 22 |
| 5.5.1. Sulfonamidas usadas como anti-sépticos..... | página 23 |
| 5.5.2. Sulfonamidas utilizadas em infecções urinárias..... | página 23 |
| 5.5.3. Sulfonamidas de uso oftálmico..... | página 24 |
| 5.5.4. Sulfonamidas em associação..... | página 24 |
| 5.5.5. Sulfonamidas em associação com outras classes de fármacos..... | página 25 |
| 5.5.6. Sulfonamidas para infecções gastrintestinais..... | página 26 |
| 5.5.7. Uso de sulfas como outras classes farmacológicas..... | página 27 |
| 5.5.8. Espectro de ação das sulfonamidas..... | página 28 |
| 5.5.9. Aspectos farmacocinéticos das sulfonamidas..... | página 28 |
| 5.6. Uso das sulfonamidas na produção animal..... | página 30 |
| 5.6.1. Avicultura..... | página 34 |
| 5.6.2. Suinocultura..... | página 39 |
| 5.6.3. Bovinocultura..... | página 40 |
| 5.7. Ações regulatórias..... | página 42 |
| 5.8. Objetivos..... | página 44 |
| 6. Capítulo I – Abordagem racional para estabelecimento de prioridades no monitoramento de resíduos de sulfonamidas em alimentos e no ambiente..... | página 45 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 7. Capítulo II – Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis..... | página 75 |
| 8. Capítulo III - Development and validation of screening and confirmatory methods for sulfonamides residues analysis by capillary electrophoresis and LC-MS/MS according to the European Union regulation 2002/657/EC..... | página 89 |
| 9. CONCLUSÕES..... | página 110 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | página 111 |
| 11. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO..... | página 126 |

1. Índice de figuras

Figura 1. Estrutura química de princípios ativos derivados da sulfanilamida.

Figura 2. Rotas metabólicas onde ocorre a ação interferente das sulfonamidas na célula humana.

Figura 3. Comportamento anfotérico das sulfonamidas.

Figura 4. Principais mecanismos enzimáticos de metabolização das sulfas.

2. Índice de Tabelas

Tabela 1. Produtos metabólicos gerados na excreção de algumas sulfonamidas.

Tabela 2. Classificação das sulfonamidas baseada na concentração plasmática obtida após administração oral de uma dose terapêutica em não-ruminantes.

3. Lista de Abreviaturas e Símbolos

SMA - sulfametoxazol

SGD - sulfaguanidina

SFA - sulfanilamida

SDMX - sulfadimetoxina

STZ - sulfatiazol

SMZ - sulfametazina

SQX - sulfaquinoxalina

SDZ - sulfadiazina

SMR - sulfamerazina

TMP - trimetoprima

PNCR – Plano Nacional de Controle de Resíduos

μ - micro

LMR – Limite Máximo de Resíduos

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

EC – eletroforese capilar

LIF – *laser induced fluorescence* (fluorescência induzida a *laser*)

CCD – cromatografia em camada delgada

4. Resumo

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e validação de um método analítico preciso, rápido, simples e de baixo custo para o monitoramento de resíduos de sulfonamidas em alimentos, que fosse capaz de ser aplicado a um grande número de amostras de distintas matrizes e que fornecesse dados quantitativos e confirmatórios da possível presença desta classe de fármacos em alimentos.

O trabalho foi realizado em quatro fases distintas. A fase I consistiu na tabulação e estudo de todas as apresentações de sulfonamidas disponíveis no mercado de produtos de uso veterinário no Brasil. Da análise farmacológica e farmacotécnica deste universo, delineou-se uma abordagem para priorização para sulfas que podem, potencialmente, permanecerem como resíduos em alimentos destinados ao consumo humano.

Na fase II, desenvolveu-se um protocolo de extração, purificação e concentração de sulfonamidas a partir de matrizes de origem animal – carne, pescado e leite. Distintas abordagens analíticas foram testadas e comparadas quanto à rapidez, recuperação de analito, repetibilidade e custo.

A fase III tratou do desenvolvimento de um método de análise por eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida a laser para análise qualitativa e quantitativa de sulfonamidas.

Na fase IV, desenvolveu-se um método confirmatório para a presença de sulfas em alimentos utilizando a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida. O método confirmatório foi validado de acordo com a

Diretiva da Comunidade Européia EC/657/2002, que estabelece os critérios mínimos de desempenho para métodos de análise de resíduos de drogas veterinárias em alimentos.

Amostras de alimentos de origem animal contendo níveis de sulfonamidas acima de 10 ng g^{-1} puderam ser analisadas, quantificadas e confirmadas através da aplicação do método desenvolvido.

4. Abstract

The aim of this work is the development of a precise, fast, simple and low cost analytical method for sulfonamide residues in food, which were able to be applied to a large number of samples of different matrices and to provide quantitative data and confirm the possible presence of this class of drugs in food.

In the initial approach of the work, all veterinary medicines containing sulfonamides available in the Brazilian market were evaluated to propose a new approach for risk assessment to prioritisation of sulfonamides that have the potential to remain as residues in food and in the environment.

After, protocols for extraction, purification and concentration of sulfonamides from matrices of animal origin were developed. Different analytical approaches were tested and compared on the speed, recovery of analyte, repeatability and cost.

In the next stage, a method based on analysis by capillary electrophoresis with detection by laser induced fluorescence was developed to allow qualitative screening of sulfonamide residues.

Finally, a confirmatory method was developed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The method was validated according to the European Community Decision EC/657/2002 which established the minimum performance criteria for methods of analysis of veterinary drugs residues in food.

Food sample containing levels of sulfonamides up to 10 ng g^{-1} could be analyzed, quantified and confirmed using the method developed.

5. INTRODUÇÃO GERAL

Sulfonamidas são uma classe de agentes antimicrobianos que apresentam um considerável uso na medicina humana e veterinária. As sulfonamidas, ou simplesmente sulfas, foram os primeiros agentes a serem utilizados para o tratamento de infecções bacterianas (Lofflin, 2005).

Durante a década de 1940 as sulfas foram consideradas fármacos de escolha para o tratamento de infecções bacterianas em humanos. Hoje, seu uso é limitado ao tratamento de doenças muito específicas na medicina humana, como infecções do trato urinário. Não obstante, as sulfas ainda são bastante utilizadas na medicina veterinária. Quando que usadas de forma equivocada, a presença destas sulfas na forma de resíduos em produtos de origem animal apresentam um potencial toxicológico relevante, capaz de desencadear reações alérgicas (Blanchflower and Rice, 1988).

Além disto, muitas pessoas apresentam hipersensibilidade a resíduos de fármacos e níveis sub-terapêuticos de substâncias com ação bactericida e/ou bacteriostática podem propiciar e acelerar processos de pressão seletiva, desencadeando o surgimento de resistência bacteriana (Kemper, 2008; Passantino, 2007).

Além disto, estudos de pesquisadores do NCTR - National Center for Toxicological Research – indicam que a sulfametazina pode apresentar atividade carcinogênica sobre a glândula tireóide (Fullerton et al., 1987; Littlefield et al., 1989; Littlefield et al., 1990).

5.1 Histórico

As sulfas foram sintetizadas pela primeira vez em 1908 por Gelmo *et al.* (Drews, 2000) como produto da busca por novos azocorantes. Seguindo a linha deste trabalho, Hoerlein *et al.* (Rubin, 2007) descobriram que corantes contendo o grupamento sulfanil apresentavam afinidade por proteínas da seda e da lã. Tal achado levou a descoberta por Eisenberg, em 1913, de que a crisolidina, um dos azocorantes estudados, possuía pronunciada ação bactericida (Iyer, 2008). Entretanto, somente em 1932 as propriedades terapêuticas das sulfas foram determinadas: Dogmagk *et al.* (DOMAGK, 1965) ao triar vários corantes, encontraram uma considerável atividade antibacteriana *in vitro* no Prontisil, ((p-[2,4-diaminofenil) azo]sulfanilamida). Logo em seguida, descobriu-se que tal atividade se devia a liberação, *in vivo*, da sulfanilamida, sendo esta portanto a fração ativa da molécula do Prontisil (Iyer, 2008). O trabalho de Dogmagk levou a uma intensa atividade de pesquisa com a sulfanilamida e diversas sulfas foram sintetizadas a partir dela nos anos 1930. Um grande número destes novos compostos demonstrou possuir atividade antibacteriana contra uma variedade de streptococci e pneumococci. Várias sulfapirimidinas introduzidas a partir de 1941 (Miert, 1994) aliavam uma potente atividade antibacteriana com toxicidade inferior às sulfas sintetizadas previamente. A partir deste ponto, muitas novas sulfas foram sintetizadas. Atualmente, cerca de 5000 diferentes compostos desta classe são conhecidos (Connor, 1998; Struller, 1968), mas somente pouco mais de 30 tem efetivo emprego, seja na medicina humana como nas ciências veterinárias. A partir do núcleo químico formado pelos grupamentos anilina e ácido

sulfônico, várias outras classes de fármacos foram sintetizadas, desde antimaláricos até agentes hipoglicemiantes (Figura 1).

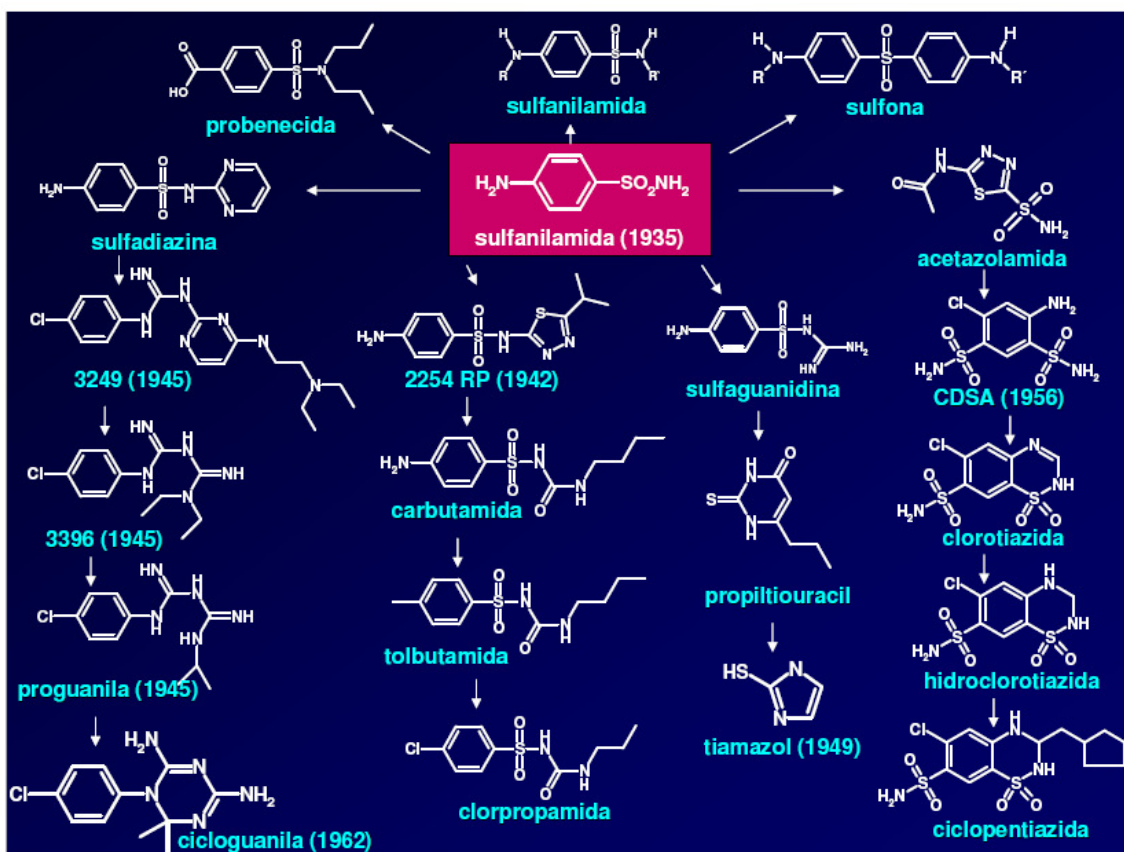


Figura 1. Estrutura química de princípios ativos derivados da sulfanilamida

5.2 Mecanismo de Ação

O mecanismo básico de ação das sulfas é bem conhecido. O componente chave envolvido é o ácido para-aminobenzóico (PABA), o qual é um componente essencial na síntese do ácido dihidrofólico (AFH₂). O ácido dihidrofólico (AFH₂) é requerido para o crescimento normal das células bacterianas, bem como das células de mamíferos. Os animais superiores são incapazes de realizar a

biossíntese do AFH2 e devem obter o mesmo na forma de folato através de fontes exógenas componentes da dieta alimentar. O folato obtido pela ingestão atravessa a membrana celular por um mecanismo de transporte ativo e é convertido em FAH2 no meio intracelular (Connor, 1998). As bactérias, no entanto, não têm meios de obter este FAH2 pré-formado e necessitam sintetizar este componente através de uma reação que envolve PABA, 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil dihidropteridina difosfato e ácido glutâmico. As sulfonamidas são análogos do PABA e, portanto, exercem seu efeito através do papel de antimetabólito. As sulfas interferem no crescimento bacteriano por afetar a produção de AFH2 de duas maneiras: inibição enzimática e por formação de pseudo-metabólito, sendo a inibição enzimática o principal modo de ação. A Figura 2 mostra as rotas de produção de AFH2. As sulfas interferem na rota metabólica no momento da conjugação via ação enzimática do PABA ou ácido para-aminobenzoilglutâmico (PABG) com 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil dihidropteridina difosfato (AHHDD) ambas necessárias à produção de FAH2. A ação antimetabólica também se origina da condensação das sulfonamidas com o AHHDD. O produto desta condensação não consegue participar da biossíntese necessária para a produção de FAH2, o que resulta em atividade bacteriostática. Um aspecto adicional importante do mecanismo de ação da classe das sulfas é que elas não são agentes bactericidas. Pela interferência na produção normal de FAH2, a reprodução bacteriana é encerrada e tem fim a multiplicação do microorganismo dentro do hospedeiro, mecanismo denominado como bacteriostático a partir do conhecimento do mecanismo de ação das sulfas (Bernstein and Lorincz, 1981).

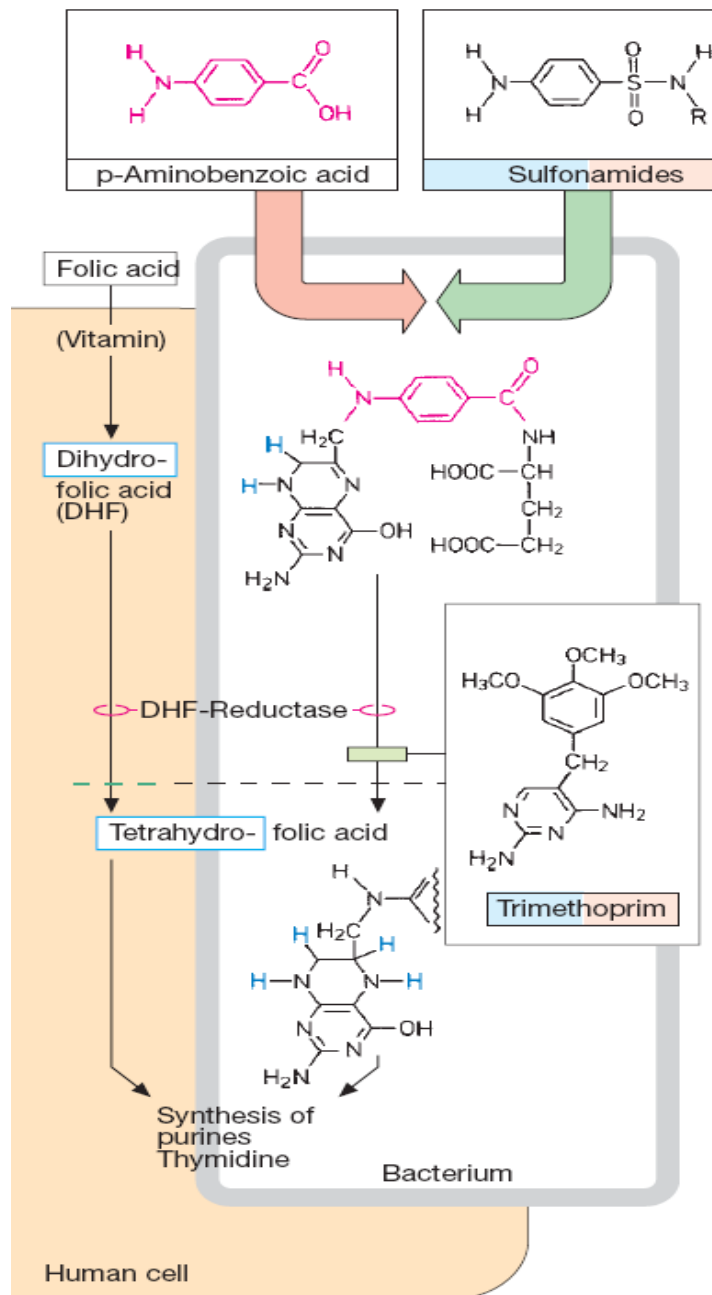


Figura 2. Rotas metabólicas onde ocorre a ação interferente das sulfonamidas na célula humana

Levando em conta que as células de mamíferos permitem a passagem do FAH2 pré-formado através da membrana celular, enquanto que as bactérias não o fazem, as sulfas não apresentam toxicidade neste sentido para o hospedeiro da infecção (Smith and Jones, 2008).

A ação das sulfas é antagonizada pelo PABA e análogos, como é o caso dos anestésicos locais análogos deste (procaína, tetracaína). A ação bacteriostática é prejudicada na presença de pus e de produtos de degradação tecidual, visto que contém quinidina e purinas que podem ser utilizadas pelas bactérias, dispensando dessa maneira a necessidade de ácido fólico (Costa-Batlioni, 1996).

Recentemente, foi demonstrado que o pseudo-metabólito originado da condensação da sulfa com o dihidropteridina pirofosfato ou simplesmente sulfa-DHP possui ação bacteriostática, embora não tenha sido possível determinar, até o momento, qual seria o alvo da ação da sulfa-DHP *in vivo* (Patel et al., 2004).

5.3 Mecanismo de resistência bacteriana às sulfonamidas

As bactérias podem adquirir resistência às sulfonamidas principalmente por três mecanismos: 1) alteração da permeabilidade da parede celular regulada por expressão gênica, com o efeito final de permitir a entrada de FAH2 pré-formado para o meio intra-celular; 2) aumento da produção enzimática; e 3) aumento da produção de metabólito essencial (Acar and Moulin, 2006).

De modo geral, pode-se considerar, para bactérias sensíveis às sulfas sistêmicas de rápida ação, uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 8 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que bactérias com CIM igual ou acima de 64 a 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas resistentes (Korolkovas and França, 2002).

Geralmente a resistência a uma determinada sulfa implica em resistência cruzada a todos os compostos do grupo. As medidas recomendadas para evitar o surgimento desta resistência consistem basicamente em abolir o uso indiscriminado das sulfas, iniciar a terapia precocemente na evolução de infecções agudas e estabelecer e manter concentrações eficazes de droga nos tecidos do animal em tratamento (Booth and McDonald, 1992).

Recentemente, vem sendo sugerido que a manutenção da homeostase entre a microbiota comensal e o hospedeiro tem um importante papel na resposta imune deste último (Kitano and Oda, 2006). Embora as ferramentas disponíveis para a verificação destes apontamentos, como os recentes desenvolvimentos em metagenoma (ou ecologia de sistemas), estejam ainda muito prematuras, especula-se que o impacto da presença de resíduos de substância com ação bactericida e bacteriostática poderia causar ação impactante sobre a microbiota humana normal e este desequilíbrio não desejado e inconsciente poderia ser motivo causal de alergias leves até desordens imunológicas de diversas classes (Venter et al., 2004).

5.4 Propriedades físico-químicas das sulfonamidas

Sulfas, como resultado das propriedades indutivas do grupamento SO_2 , são compostos que exibem comportamento anfotérico, por possuírem grupamentos químicos com caráter ácido e básico, o que permite que em determinadas faixas de pH estas moléculas se comportem como zwitteríons (Figura 3), ou seja, capazes de manter carga formal positiva e negativa. É bem estabelecido que este comportamento desempenha um importante papel na atividade antibacteriana das sulfas. Trabalhos de Korolkovas, bem como de Struller, determinam que a relação entre a constante de dissociação ácida e a atividade bacteriostática descreve um arco parabólico apresenta um máximo entre pK_a 6 e 7,5 (Korolkovas and Tamashiro, 1973, 1974a, b). Estes autores concluem que a forma iônica do fármaco é mais ativa do que forma neutra, mas que sulfas demasiadamente ácidas sofrem diminuição da atividade pelo fato do grupo SO_2 ser menos eletronegativo do que nas sulfas moderadamente ácidas (Struller, 1968).

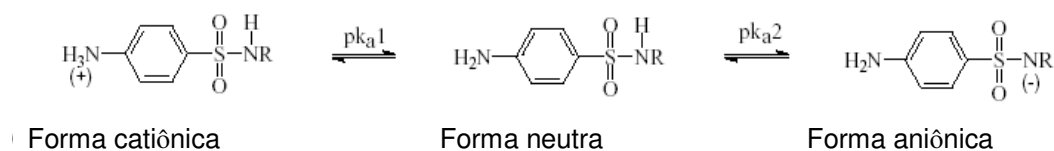


Figura 3. Comportamento anfotérico das sulfonamidas

Um grave problema no uso das sulfonamidas é a mudança de sua solubilidade com a variação do pH, que acarreta freqüentemente em deposição de cristais de sulfas no tecido renal e presença de cristalúria em pacientes sob tratamento com estes compostos; problema este que está fundamentado em princípios físico-químicos simples. A solubilidade de uma sulfonamida em uma solução tamponada ou em urina pode ser predita por duas constantes, a solubilidade da forma não-dissociada e a constante de dissociação ácida do composto. Para fins fisiológicos, muitas sulfas podem ser administradas na forma de ácidos monobásicos, cuja forma não-dissociada é fracamente solúvel, mas cujos sais básicos são altamente solúveis (KREBS and SPEAKMAN, 1945).

O grupamento p -NH₂ é essencial para a atividade; quando substituído, deve regenerar *in vivo* o NH₂ para ser ativo. É o caso de pró-fármacos como o ftalilsulfatiazol e a sulfassalazina que liberam, *in vivo*, o sulfatiazol e a sulfapiridina, respectivamente. Em geral, as sulfas são pós cristalinos brancos, geralmente pouco solúveis em H₂O, mas seus sais sódicos são facilmente hidrossolúveis (Korolkovas and França, 2002).

5.5 Propriedades farmacológicas das sulfonamidas

As sulfonamidas tópicas são indicadas para vaginites causadas por *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, mas com eficácia incerta. O fármaco de eleição seria o metronidazol, por via oral. As principais formas

farmacêuticas de uso vaginal são cremes e óvulos (Riviere et al., 2003). Outras sulfas são muito utilizadas topicamente para profilaxia de tratamento de infecções, como no caso de queimaduras, como é o caso da sulfadiazina de prata, mafenida (4- aminometilbenzenossulfonamida), sulfacetamida e sulfanilamida (Bernstein and Lorincz, 1981).

As mais comumente utilizadas para vaginites são o sulfatiazol e uma associação tríplice (sulfadiazina, sulfamerazina e sulfatiazol), sendo esta última para o caso de vaginites causadas por *Haemophilus vaginalis* (Reali et al., 2005).

5.5.1 Sulfonamidas usadas como anti-sépticos

A **sulfanilamida**, primeira e mais simples das sulfas, é ainda utilizada apenas para tratamento de vulvovaginites causadas por *Candida albicans* (Reali et al., 2005).

A **sulfacrisoidina** (carboxissulfamidocrisoidina) é a forma latente da SFA, onde o ácido 3,5-diaminobenzóico está ligado à SFA por ligação azóica; é usada para assepsia de queimaduras e ferimentos; no Brasil é presente em associações para amigdalite (Korolkovas and França, 2002).

5.5.2 Sulfonamidas utilizadas em infecções urinárias

São elas a sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametizol, sulfametoxazol e sulfametoxipiridazina. SDZ, SMA e SMP estão relacionadas no grupo das sulfas com ação sistêmica (Korolkovas and França, 2002).

A **sulfacetamida** (N-sulfanilacetamida), usada como sal sódico, é rapidamente absorvida do trato gastrintestinal, possui uma meia-vida de 7 a 12,8 horas. Sua excreção é rápida, por via urinária, sendo a maior parte inalterada (Struller, 1968).

O uso é por via oral em infecções urinárias; via tópica em infecções ginecológicas, oftalmológicas e dermatológicas. Sua ação é considerada curta e geralmente só é encontrada em associações.

O **sulfametizol** possui ação ultracurta, sendo rapidamente absorvido no trato gastrintestinal; possui ligação às proteínas em torno de 90%; é ligeiramente acetilado, sendo rapidamente excretado. A meia-vida plasmática é de 1,5-1,6 horas, pouco tóxico e atinge alta concentração no trato urinários, de forma rápida porém fugaz (Hirakawa et al., 1995). Só disponível no Brasil em associações.

5.5.3 Sulfonamidas de uso oftálmico

Usadas topicamente para infecções oculares superficiais e/ou causadas por *Chlamydia*. No Brasil, a única disponível é a **sulfacetamida** (Korolkovas and França, 2002).

5.5.4 Sulfonamidas em associação

Os medicamentos contendo associações entre duas ou mais sulfas tem eficácia incerta, e geralmente não são racionais sob o ponto de vista farmacológico e farmacotécnico (Korolkovas and França, 2002).

5.5.5 Sulfonamidas em associação com outras classes de fármacos

As associações mais racionais contém uma única sulfa associada à trimetoprima ou pirimetamina. A principal sulfa utilizada em associação é o sulfametoxazol. Esta sulfa apresenta ligação às proteínas plasmáticas de moderada a alta; sofre biotransformação parcial (15-25%); volume de distribuição é cerca de $0,36 \text{ L Kg}^{-1}$ (Brumfitt and Hamilton-Miller, 1982).

A associação do sulfametoxazol com trimetoprima possui bom sinergismo de ação; amplia o espectro pela soma das ações. É mais difícil que ocorra surgimento de resistência com o uso desta associação (Duijkeren et al., 1994).

A resistência à esta associação surge por aumento nos níveis de dihidrofolato redutase; produção de enzima alterada e diminuição da permeabilidade bacteriana ao trimetoprima.

O mecanismo de ação da associação é pelo bloqueio seqüencial das duas enzimas da biossíntese do ácido fólico dos microorganismos.

As concentrações plasmáticas máximas ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ SMA e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ TMP) são obtidas entre 1 e 4 horas após a administração. A meia-vida para o SMA é de 11 horas e de 10 hs para trimetoprima. O volume de ligação às proteínas plasmáticas é de cerca de 70% para SMA e 44% para o trimetoprima, com um volume de distribuição de $0,21 \text{ L Kg}^{-1}$ para SMA e $1,8 \text{ L Kg}^{-1}$ para trimetoprima. O trimetoprima é mais lipofílico e apresenta maior concentração nos tecidos afins (Van Der Ven et al., 1997).

A excreção renal se dá por filtração e secreção; para o SMA, cerca de 20 a 30% da dose excretada está na forma de fármaco ativo e as frações restantes são excretadas como metabólitos acetilados e conjugados glicurônicos); no caso do trimetoprima, cerca de 50 a 60% da dose inicial é eliminada pela urina em 24 horas, sendo 80% em forma inalterada (Cribb et al., 1996).

As principais indicações para o uso desta associação são inflamações do trato urinário e enterocolites por *Shigella*, sendo o fármaco de eleição para *Pneumocystes carinii* e profilaxia de diarreia dos viajantes (Miert, 1994).

5.5.6 Sulfonamidas para infecções gastrintestinais

São fármacos latentes, obtidos como pró-fármacos praticamente insolúveis em meio aquoso, logo são muito pouco absorvidos no trato gastrintestinal, atingem alta concentração na luz do cólon, onde a hidrólise bacteriana libera a sulfa matriz como droga livre (Rubinstein, 1995).

No Brasil, estão disponíveis em associações, principalmente antidiarréicas; algumas são para infecções urinárias. Não há justificativa racional para sua existência, dada a existência de fármacos mais adequados e aos riscos envolvidos em supressão diarréica por via medicamentosa. As principais sulfas utilizadas para este fim são a **formossulfamerazina**, **formossulfatiazol**, **ftalilsulfatiazol** e **sulfaguanidina** (Mizuno et al., 1986).

De acordo com as orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS), em seu Formulário de Medicamentos Básicos, a utilização das sulfonamidas é hoje bastante limitada pela crescente incidência de resistência bacteriana (WHO, 2002). Para muitas de suas indicações, ocorreu uma substituição por antibióticos mais ativos e mais seguros. Somente algumas sulfonamidas são recomendadas como fármacos de eleição pela OMS. É o caso da sulfadiazina que é utilizada na prevenção da febre reumática recorrente e na forma de sais de prata para assepsia de queimaduras. O sulfametoxazol em combinação com trimetoprim também continua sendo recomendado como fármaco de eleição para muitas infecções urinárias (WHO, 2002).

5.5.7 Usos de sulfas como outras classes farmacológicas

São usadas algumas sulfas sistêmicas em associações antimaláricas. São elas a sulfadiazina, sulfadoxina, e sulfametoxipiridazina. A associação mais eficaz e utilizada é pirimetamina:sulfadoxina (1:20). Apresentam sinergismo, sendo que a sulfa atua sobre a dihidrofolato redutase e a pirimetamina sobre a dihidropteroato sintase, ambas envolvidas na síntese do ácido fólico dos parasitas. Algumas cepas de *P. falciparum* desenvolvem resistência à associação. A mesma também é eficaz na profilaxia de pneumonia por *Pneumocystis carinii* (Chattopadhyay et al., 2007).

O uso desta associação deve levar em conta a relação risco-benefício, pois pode provocar leucopenia e trombocitopenia; o tratamento deve acompanhar hemograma regular (Ibezim and Odo, 2008).

5.5.8 Espectro de ação das sulfonamidas

O espectro antimicrobiano é amplo: possui atividade contra bactérias Gram negativas e Gram positivas, além de certos fungos e protozoários (Korolkovas and França, 2002).

5.5.9 Aspectos farmacocinéticos das sulfonamidas

Por via oral, são rapidamente absorvidas no trato gastrintestinal; de modo geral, 70% a 100% da dose oral sofre absorção. Distribuem-se por todos os tecidos; atravessam a barreira placentária e são excretadas no leite. Níveis séricos de 5 mg% a 15 mg% de droga “livre” (não ligada a proteínas) são terapeuticamente eficazes para a maioria das infecções (Korolkovas and França, 2002).

A biotransformação é hepática, por mecanismos de acetilação, formando N₄-acetil derivados que são metabólitos inativos, mas que apresentam retenção da toxicidade. A conjugação pode ocorrer com ácido glicurônico, mas esta não é a via preferencial. A excreção é renal, por filtração glomerular (Miert, 1994).

Em medicina humana, é relatada uma ampla diversidade de efeitos adversos para as sulfas, efeitos estes que podem ir de graves à fatais, sendo comumente citados pruridos, reações de fotossensibilidade, hepatite química, síndrome de Stevens-Johnson, necrose epidérmica tóxica, necrose hepática fulminante, agranulocitose, anemia aplásica e outras discrasias sanguíneas (Booth and McDonald, 1992).

Entre as interações medicamentosas melhor estabelecidas, estão o sinergismo com eritromicina e com o trimetoprima. As sulfas podem, igualmente, potencializar os efeitos da fenilbutazona e interferir na ação das penicilinas, já no alvo bacteriano. Como já citado anteriormente, anestésicos locais – análogos do PABA – antagonizam seus efeitos (Costa-Batllore, 1996).

Em relação à seu perfil farmacocinético as sulfas são usualmente classificadas como a) sulfas sistêmicas de ação curta, com absorção e excreção rápida; meia-vida entre 4-7 horas. As principais são a sulfamerazina, sulfatiazol e sulfametizol. b) sulfas sistêmicas de ação intermediária, meia-vida entre 10-12 horas. Exemplos são a sulfadiazina e o sulfametoxazol. C) sulfas sistêmicas de ação longa – maior porcentagem de absorção e excreção lenta, com meia-vida sérica de 35-40 horas; uma exceção é a sulfadoxina, de ação ultra-longa (7-9 dias) (Peters et al., 2007). Por não oferecerem vantagens clínicas sobre as de ação curta e intermediária, e por apresentarem risco toxicológico muito mais elevado, estas sulfas não são mais comercializadas em alguns países, como por exemplo a sulfametoxipiridazina.

5.6 Uso das sulfonamidas na produção animal

A duração de um efeito quimioterapêutico é geralmente determinada pela especificidade do agente à certos mecanismos enzimáticos e atividade metabólica próprias de cada espécie. Muitas substâncias com ação farmacológica são sujeitas à modificações bioquímicas antes de serem excretadas pelo organismo. Somente uma pequena quantidade da dose total aplicada permanece indiferenciada. O metabolismo dos compostos farmacológicos, bem como de xenobióticos em geral, é determinante para seus perfis farmacodinâmico e farmacocinético. Décadas de investigação nas áreas de bioquímica, farmacologia

e toxicologia revelam que, a despeito do imenso número de compostos com ação farmacológica, um número relativamente pequeno de mecanismos enzimáticos parece estar envolvido (Reimerdes and Thumim, 1970).

REIMERDES e THUMIM revisaram as principais vias metabólicas que agem sobre as sulfonamidas. Uma síntese destes dados está exposta na Tabela 1. As sulfas, como grupo, estão suscetíveis a muitas modificações metabólicas. Quatro principais mecanismos enzimáticos podem ser listados (Figura 4):

1. Acetilação
2. Hidroxilação
3. Glicuronação
4. Formação de sulfato éster

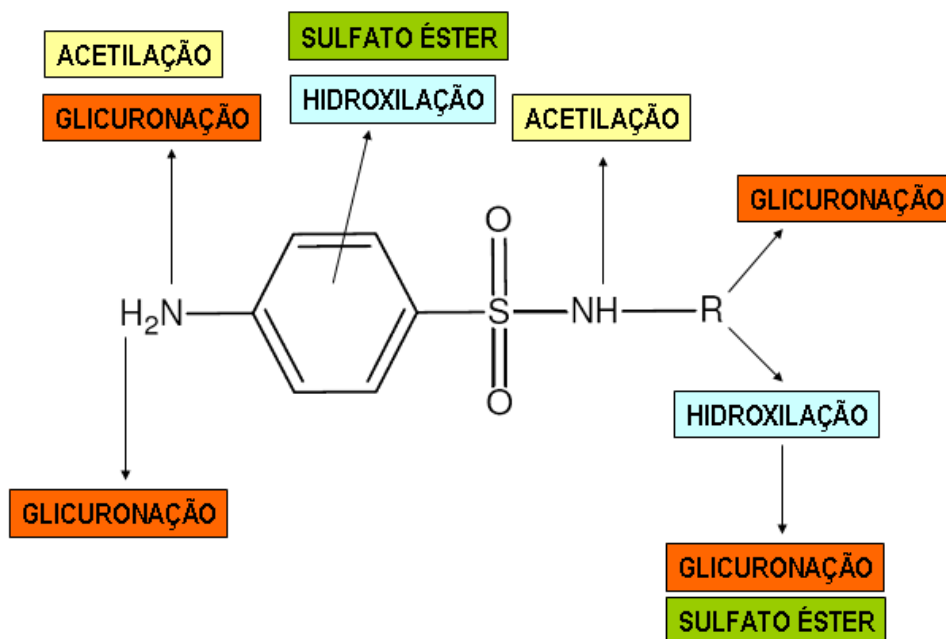


Figura 4. Principais mecanismos enzimáticos de metabolização das sulfas

A acetilação do grupamento amina ligado ao anel aromático das sulfas foi uma das primeiras reações do metabolismo destes compostos que foi estudado e elucidado. Esta forma de metabolização é comum para todas as sulfas, mas é extremamente dependente da espécie alvo bem como do substrato. Não obstante, é sem dúvida o sistema majoritário de metabolização destes fármacos. O estudo da acetilação das SFAs levou à eventual identificação da acetil coenzima A. Investigações em diferentes órgãos mostram que a acetilação das sulfas se dá majoritariamente no fígado mas também ocorre em quantidade significativa nos rins.

Esta via de metabolização tem um relevante papel por ser a via de formação dos derivados N⁴-acetilados das sulfas, os quais apresentam efeitos indesejados no sistema renal, como albuminúria, oligúria e anúria (Reimerdes and Seydel, 1969).

Tabela 1. Produtos metabólicos gerados na excreção de algumas sulfonamidas

| Sulfa | Excreção na forma livre (%) | Derivados metabólicos excretados | | | Espécie |
|--------------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------|-------------------------|------------|
| | | Acetilados (%) | Glicuronados (%) | Sulfato éster (%) | |
| SFA | 62 | 38 | -- | -- | Homem |
| | 10 – 50 | 40 – 80 | -- | 7-9 | Coelho |
| SGD | 60 | 40 | -- | -- | Homem |
| | 12 | 88 | -- | -- | Coelho |
| | 50 | -- | 50 | -- | Camundongo |
| SPY | 30 | 20 - 60 | -- | -- | Coelho |
| | 20 | 39 | 41 | -- | Homem |
| | -- | -- | 100 | -- | Cão |
| | -- | 100 | 28 | -- | Coelho |
| SDZ | 50 – 70 | 20 - 35 | 10 | -- | Homem |
| | -- | 75 | -- | -- | Coelho |
| SMR | 30 | 55 | 15 | -- | Homem |
| | 39 - 57 | 37 | 12 - 24 | -- | Homem |
| | 6 | 90 | 4 | -- | Coelho |
| SDMX | 5 | 17 | 78 | -- | Homem |
| | 23 | 55 | 22 | -- | Coelho |
| STZ | 64 | 29 | 12 | 0.5 | Homem |
| | 43 | 12 | 42 | 2.5 | Coelho |
| Sulfisoxazol | 60 | 20 | 20 | -- | Homem |

Adaptado de (Reimerdes and Thumim, 1970). SFA = sulfanilamida; SGD = sulfaguanidina; SPY = sulfapiridina; SDZ = sulfadiazina; SMR = sulfamerazina; SDMX = sulfadimetoxina; STZ = sulfatiazol.

5.6.1 Avicultura

As sulfonamidas de maior utilização na avicultura são sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfamerazina, sulfatiazol e sulfadiazina (Wassenaar, 2005). Estes compostos tem sido amplamente usados como agentes terapêuticos neste tipo de cultura, principalmente para o controle da coccidiose, pulorose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas. A associação diaminopirimidinas-sulfonamidas (trimetoprima e congêneres) tem sido aplicada para controle de infecções por *E. coli*, *Haemophilus paragallinarum*, cólera aviária (*Pasteurella multocida*) e salmoneloses (Hafez, 2003; Kuenzel et al., 2004).

A via preferencial de administração de sulfas e associações com diaminopirimidinas em aves é por via oral, através da água de bebida e da ração e somente em casos de coriza e cólera aviária são ocasionalmente prescritos aplicação parenteral nos indivíduos muito afetados, paralelamente ao seu uso oral (Booth and McDonald, 1992; Spenser, 2004). A Tabela 2 mostra a classificação sistemática das sulfas utilizadas em aves de acordo com seu tipo de ação.

Tabela 2. Classificação das sulfonamidas baseada na concentração plasmática obtida após administração oral de uma dose terapêutica em não-ruminantes (Booth and McDonald, 1992)

| Tipo | Concentração plasmática | Sulfa |
|--------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ação curta | > 50 µg mL ⁻¹ em menos de 12 horas | Sulfacetamida Sulfametazol Trissulfapirimidina Sulfatiazol Sulfametoxazol |
| Ação intermediária | ≥ 50 µg mL ⁻¹ em 12 a 24 horas | Sulfadimetoxina Sulfisoxazol Sulfametoxazol Sulfapiridina Sulfaclopiridazina Sulfametazina Sulfadiazina |
| Ação prolongada | ≥ 50 µg mL ⁻¹ após 24 horas | Sulfametilfenazol Sulfabromometazina Sulfadimetoxina Sulfametazina Sulfametoxipiridazina |
| Entérica | Sem absorção significativa | Succinilsulfatiazol Formosulfatiazol Sulfaguanidina Ftalilsulfatiazol Sulfasalazina |

Embora não existam dados oficiais disponíveis, é possível inferir que a sulfaquinoxalina seja a sulfa mais utilizada em avicultura industrial, por sua aplicação no controle da coccidiose, patologia de maior incidência nesta cultura. SQX também tem sido prescrita como auxiliar na redução de perdas por mortalidade decorrentes de infecções por *Pasteurella multocida*, *Salmonella gallinarum* e paratifo na dose de 30 mg kg⁻¹ ou a 0,1% na ração por dois a três dias e metade desta dose nos dois dias seguintes (Booth and McDonald, 1992).

As sulfonamidas possuem um limite muito estreito entre o seu efeito terapêutico e o tóxico e mesmo níveis terapêuticos podem causar efeitos deletérios sobre o sistema imune, hematopoiético e reprodutivo das aves. Em determinadas circunstâncias podem causar diminuição da taxa de crescimento de frangos de corte e perus; por esta razão devem ser utilizadas com muito critério. A associação das sulfonamidas com as diaminopiridinas (trimetoprim e ormetoprim) reduz riscos de toxicidade porque se pode diminuir a dose da sulfa. As diaminopiridinas são pouco tóxicas, mas podem causar, somente quando utilizadas em doses muito elevadas, deficiência de ácido fólico e hipercalcemia (Furusawa and Hanabusa, 2002; Furusawa and Tsuzukida, 1998).

As sulfonamidas são relativamente insolúveis na água e frente a pH ácido tendem a se cristalizar e sedimentar, como também são difíceis de serem misturadas na ração. Quando utilizadas na ração, deve-se estar atento ao cálculo preciso da dose em função do consumo de água ou de ração. Por exemplo, em doenças como a coriza e cólera aviária, é preferível administrar a sulfonamida indicada, por via parenteral, nas aves prostradas e nas demais aves em contato, doses preventivas ou de suporte por via oral (Appelgren et al., 2000).

Em poedeiras comerciais, 0,05% de sulfadimetoxina na água de bebida ou 0,10% de sulfaquinoxalina pode causar queda de produção, perda da qualidade da casca do ovo, produção de ovos vermelhos despigmentados e aumento de mortalidade. Em frangos de corte é comum observar-se queda do ganho de peso e intoxicação em decorrência de consumo elevado de ração ou de água. Em dias quentes ou em ambientes com temperaturas acima de 27°C podem-se observar quadros tóxicos devido ao aumento do consumo de água, principalmente quando se preconiza o uso direto de sulfa na água de bebida. Quando se administram as sulfas na ração deve-se levar em consideração a energia (baixa energia, maior consumo) para se evitar efeitos tóxicos (Booth and McDonald, 1992).

São efeitos adversos ou colaterais que podem ocorrer:

- Potencialização dos efeitos mórbidos de anemia infecciosa, da doença de Gumboro e da hepatite por corpúsculo de inclusão e vice-versa, decorrente de efeitos colaterais sobre o sistema imune e sangue circulante (Emmerich and Ungemach, 2004).
- Aumento na incidência e na gravidade da deficiência de vitamina K em aves com menos de 3 semanas de idade ou em aves que passam por episódio de perda de sangue (por exemplo, debicagem, coccidiose por *E. tenella* e *E. necatrix*). A sulfaquinoxalina é um inibidor potente da redutase epóxido da vitamina K e, por esta via, pode causar trombocitopenia. Em um período tão curto quanto 24 horas após sua administração, pode-se observar um aumento do tempo de coagulação e aumento de predisposição para ocorrência ou persistência de hemorragias musculares e viscerais (Fayer and Ungar, 1986).

- Em aves desidratadas ou com acidose metabólica, as sulfonamidas podem induzir um quadro de cristalúria. Aves com nefropatias causadas por substâncias tóxicas (aflatoxina, ocratoxina) ou mesmo decorrente de Gumboro ou bronquite infecciosa têm maior risco para ocorrência de nefrite-nefrose (Julian, 2005).
- As sulfonamidas não podem ser utilizadas em frangos de corte que recebem ionóforos porque podem causar redução do ganho de peso e miodegeneração. A sulfaclorpirazina e a sulfaquinoxalina são incompatíveis com monensina, narasina e salinomicina, enquanto a sulfadimetoxina é incompatível com a lasalocida, monensina e narasina e não são conhecidos seus efeitos em relação à salinomicina e maduramicina. A sulfametazina e a sulfaquinoxalina pode ser usada como a lasalocida e sabe-se que a sulfametazina não pode ser associada com a monensina (Fayer and Ungar, 1986; Joyner, 1981).
- As sulfonamidas não podem ser utilizadas em galinhas com mais de 16 semanas de idade. Mesmo quando associadas com as diaminopirimidinas, as sulfonamidas podem causar redução do apetite, queda do consumo de água, da produção de ovos, do peso do ovo e da eclosão quando houver consumo de doses acima do recomendado. Concentrações de 0,05% de sulfaquinoxalina podem causar mortalidade elevada de poedeiras e ocorrência de hepatomegalia, hemorragias no coração, rim, oviduto, intestino, proventrículo, ceco, medula óssea pálida e dermatite gangrenosa. Deve-se redobrar os cuidados quando associadas com olaquinox ou o carbadox (Booth and McDonald, 1992; Furusawa and Tsuzukida, 1998).

- Como consequência das alterações sangüíneas e da medula óssea causadas pelas sulfonamidas, observam-se imunossupressão e aumento de casos de granulomas focais sépticos nos órgãos das aves intoxicadas.

As sulfonamidas não devem ser utilizadas como aditivos alimentares e no Brasil, está vetado o uso de sulfonamida sistêmica em aves (MAPA, 1992). Quanto ao uso terapêutico em frangos de corte, deve-se respeitar em tempo de retirada da sulfa, 5 dias antes do abate e em poedeiras o descarte de ovos nos 10 primeiros dias após o término do tratamento devido à presença de resíduos (Booth and McDonald, 1992).

5.6.2 Suinocultura

A utilização de sulfonamidas em suínos é uma prática comum nesta cultura e tem sido responsável pelo maior número de amostras violadas em nível internacional, ou seja, amostras contendo quantidades de resíduos de SMZ em concentração superior aos limites máximos estabelecidos (Cordle, 1989; Lee and Ryu, 1999) .

A sulfametazina, também conhecida como sulfadimidina, é comumente utilizada em veterinária em combinação com tetraciclina e penicilina para promoção de crescimento de porcos. Além deste uso, é indicada para tratamento de pneumonia bacteriana, colibacilose suína, enterite bacteriana suína e redução na incidência de abscessos cervicais.

Os principais resíduos encontrados nos tecidos de suínos aos quais foi

administrada sulfametazina são, em ordem quantitativa decrescente - droga mãe, N₄-acetil-sulfametazina, N₄-glicoconjugado sulfametazina, desaminosulfametazina (Appelgren et al., 1998).

O sulfatiazol sódico e utilizado também em associação com tetraciclina e penicilina para aumento de peso e melhoramento das taxas de conversão alimentar em porcos (Appelgren et al., 1998) .

5.6.3 Bovinocultura

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da natureza. Apresenta uma composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente cálcio) sendo fonte essencial à saúde do homem.

Produzido durante a lactação, a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula mamária, pode em situações específicas, conter resíduos de medicamentos ou drogas de uso veterinário.

Temas relacionados aos níveis de segurança e tolerância a serem estabelecidos, métodos oficiais de monitoramento, níveis de sensibilidade dos testes rápidos de detecção disponíveis no mercado, destino do leite contaminado, tipo de incentivo ou penalidade a ser instituída para se atingir metas de qualidade, credibilidade das informações relacionadas ao período de descarte do leite contidas nas bulas de medicamentos, vêm sendo muito discutidas.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode levar à ocorrência de seleção de microrganismos patogênicos resistentes e desencadear reações de

hipersensibilidade (COSTA, 1999). É também um problema econômico e social, a partir do momento que interfere nos processos industriais de produção e conservação de derivados do leite e leva à penalização do produtor (COELHO, 2000).

A mastite, processo inflamatório da glândula mamária, é a principal causa para o tratamento de vacas em lactação com antibióticos e sulfonamidas (COSTA, 1999).

O processo inflamatório envolve uma série de alterações fisiológicas que podem exercer influência sobre a farmacocinética e farmacodinâmica de medicamentos de uso intramamário utilizados na terapêutica da mastite e, daqueles administrados por via sistêmica, para tratamento desta ou de outras afecções (Booth and McDonald, 1992) Em glândulas mamárias com processo inflamatório, ocorre aumento da permeabilidade glandular, o que favorece uma maior difusão dos antimicrobianos (COSTA, 1999).

Assim, o processo inflamatório, associado ou não às práticas de antibioticoterapia inadequadas, aumenta o risco da presença de resíduos de antibióticos no leite podendo, inclusive, determinar períodos de eliminação além daqueles estabelecidos nas bulas dos medicamentos (Acar and Moulin, 2006; COSTA, 1999).

5.7 Ações regulatórias

Várias ações foram levadas à cabo em anos recentes, incluindo o Codex Alimentarius, com o objetivo de estabelecer Limites Máximos de Resíduos (LMR) para certas sulfonamidas.

Os resíduos de sulfonamidas tem sido um problema nos EUA durante os últimos 25 anos. Durante os últimos 20, as sulfas tem produzido mais violações de LMR do que qualquer outra classe de fármaco, com a maior incidência ocorrendo em suínos (Cordle, 1989; Lee and Ryu, 1999; Wassenaar, 2005). O US Food and Drug Administration (FDA) começou a investigar sulfonamidas no começo dos anos 1970, quando as empresas solicitantes de registro para sulfas foram questionadas sobre dados que permitissem ao FDA uma melhor avaliação da toxicidade destes compostos, em especial sobre sua potencial tireoidotoxicidade.

Em 1990 o FDA iniciou procedimentos para a retirada da sulfametazina (a sulfonamida mais amplamente utilizada). Foi demonstrado que a mesma causa tumores malignos em animais de experimentação (NTCR, 1988).

Avaliações do comitê misto FAO/OMS de especialistas em aditivos e contaminantes (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives -JECFA) tem publicado periódica e sistematicamente recomendações sobre o tema dos resíduos de fármacos de uso veterinário em alimentos (Appelgren et al., 2000; Appelgren et al., 1998; Arnold et al., 2004).

Na 42ª reunião do JECFA, em fevereiro de 1994, os estudos investigando o mecanismo de ação da sulfametazina na glândula tireóide e informações adicionais relacionadas com genotoxicidade, embriotoxicidade e teratogenicidade foram revisados (Anadon et al., 2006). Embora tenha sido reconhecido de que os primatas (incluindo os humanos) são menos suscetíveis do que roedores e suínos aos efeitos anti-tireóideos das sulfonamidas, a ingestão de alimentos contendo resíduos de sulfonamidas pode desencadear severas reações de hipersensibilidade. O Comitê reconheceu que a notificação documentada de tais casos pode ser extremamente difícil, se não impossível, de ser obtida. Em consonância com a avaliação feita previamente (Appelgren et al., 1998), o comitê recomendou que o LMR deveria ser estabelecido em valor baixo e praticável, de acordo com as boas práticas de uso de fármacos veterinários. Os valores recomendados para gado bovino, ovino, suínos e aves foi de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ como sulfametazina em músculo, fígado, rim e gordura. O LMR recomendado para SMZ em leite foi de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$. Os dados disponíveis para resíduos em ovos indicam que o uso de SMZ em aves poedeiras pode resultar em uma altíssima concentração de SMZ nos ovos. Por esta razão, o comitê considera que SMZ não deve ser utilizada em aves poedeiras e não recomendou nenhum LMR para ovos.

No Brasil, a legislação impõe uma quantidade máxima de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ de resíduos de sulfonamidas em tecidos comestíveis animais (Alaburda et al., 2007). O monitoramento destes resíduos se dá através do Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR), executado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em sua rede de laboratórios oficiais. As amostras são oriundas dos estabelecimentos que possuem Serviço de Inspeção Federal (SIF) e o método

oficial de análise laboratorial para sulfonamidas se dá por triagem em cromatografia de camada delgada (CCD) e posterior quantificação por densitometria (DST). As análises são executadas em fígado e músculo de aves, suínos, bovinos e eqüinos. No período 1990-1994, a prevalência, definida pelos limites de confiança, foram de 8-17% de sulfametazina em fígado suíno e de 1-5% para presença de sulfaquinoxalina em fígado de aves (LEITE and JOKL, 1996).

5.8 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar métodos de análise de resíduos de sulfonamidas em produtos de origem animal utilizando eletroforese capilar e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Objetivos específicos

- Delinear o perfil dos medicamentos contendo sulfonamidas existentes no mercado veterinário brasileiro.
- Propor abordagens para priorização de sulfonamidas com potencial de deixar resíduos em alimentos e no ambiente.
- Desenvolver método de análise de sulfonamidas em alimentos, utilizando eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida a laser.
- Desenvolver e validar método de análise de sulfonamidas em alimentos, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, atendendo aos requisitos mínimos de validação estabelecidos na legislação pertinente.

Capítulo I – Abordagem racional para estabelecimento de prioridades no monitoramento de resíduos de sulfonamidas em alimentos e no ambiente.

Este manuscrito será submetido à publicação no periódico *Pesquisa Agropecuária Brasileira* e apresenta uma proposta de método para priorizar fármacos para pesquisa de resíduos tanto no ambiente como em alimentos.

Abordagem racional para estabelecimento de prioridades no monitoramento de resíduos de sulfonamidas em alimentos e no ambiente

Rodrigo Hoff^(1,2) e Tarso B. L. Kist⁽¹⁾

⁽¹⁾Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS. ⁽²⁾ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Estrada da Ponta Grossa, 3036 CEP 91780-580 Porto Alegre, RS. E-mail: rodrigo.hoff@agricultura.gov.br

Resumo – o objetivo deste trabalho é apresentar uma proposta para elencar prioridades na pesquisa de resíduos de fármacos de uso veterinário utilizados em larga escala na produção animal tanto em alimentos destinados ao consumo humano como no ambiente. Para exemplificar o modelo proposto, adota-se neste trabalho o exemplo específico das sulfonamidas, analisando-se as apresentações farmacêuticas disponíveis no mercado veterinário nacional.

Termos para indexação: sulfas, análise de resíduos, medicamentos veterinários.

Rational approach to setting priorities in the monitoring of sulfonamides residues in food and the environment

Abstract - The purpose of this work is to present a proposal for lists priorities in the research of veterinary drugs used in large-scale livestock production, which can produce

residue levels both in food and the environment. To illustrate the proposed model, the specific example of sulfonamides was applied, analyzing all pharmaceutical presentations available on the Brazilian veterinarian market.

Index terms: sulphonamides, residues analysis, veterinary drugs.

Introdução

Medicamentos veterinários são utilizados no mundo todo para promover a saúde animal, propiciar ganhos econômicos e aumento da produtividade da indústria de alimentos de origem animal (Acar and Moulin, 2006; BRASIL, 2000). Se as boas práticas veterinárias não forem rigorosamente observadas, e os períodos de carência pré-abate ou coleta não forem cumpridos, ocorrerá permanência de resíduos destes medicamentos nos tecidos destinados à produção de alimentos (Anadon et al., 2006; Strucinski et al., 2007). A questão dos resíduos de medicamentos veterinários (RMVs) levou ao desenvolvimento de legislações e regulamentações próprias tanto no âmbito nacional como entre blocos econômicos e órgãos internacionais como o Codex Alimentarius, com o propósito de propor e, posteriormente, harmonizar valores de limites máximos de resíduo (LMR) para as diversas combinações fármaco / matriz. O estudo dos potenciais efeitos da ingestão de alimentos contendo quantidades acima do LMR foi e segue sendo uma área de pesquisa de grande relevância, já que diz respeito diretamente à saúde pública bem como às relações comerciais internacionais. A análise de resíduos de fármacos veterinários é uma fração vital dos programas de monitoramento estabelecidos pelas agências reguladoras em praticamente

todos os países envolvidos com exportação e importação de alimentos. A demanda pelo controle regulatório de contaminantes químicos em alimentos expandiu-se dramaticamente nas últimas décadas, fazendo da área de análise destes resíduos um importante fator a ser considerado no comércio internacional de *commodities* (Anadon et al., 2002; Blackwell et al., 2005).

Durante muito tempo esta foi a principal preocupação dos legisladores e pesquisadores da área. Entretanto, recentemente o foco de estudo a respeito dos RMVs tem se voltado para o impacto destes compostos sobre o ambiente (Bloom, 2004; Boxall, 2004; Boxall et al., 2004a; Boxall et al., 2004b; Boxall et al., 2006; Boxall et al., 2003). Após a administração, estes fármacos são liberados no ambiente através de processos de excreção dos animais, sendo que estas substâncias podem migrar para distintos recursos hídricos. Vários estudos têm relatado a ocorrência de RMVs em águas superficiais, lençóis freáticos e efluentes de estações de tratamento (Acar and Moulin, 2006; Kolpin et al., 2002; Yang and Carlson, 2003; Zilles et al., 2005). Muitos pesquisadores têm investigado possíveis atividades biológicas indesejadas no meio ambiente causadas pelos RMVs. Já foram relatadas ações sobre espécies não-alvo que incluem disrupção endócrina, inibição reprodutiva e até mesmo respostas em nível de ecossistema (Blackwell et al., 2005; Campagnolo et al., 2002; Floate et al., 2001; McCracken and Foster, 1993; Renaud et al., 2004; Scott Teeter and Meyerhoff, 2003; Wall and Strong, 1987).

A rota que transporta RMVs para o lençol freático é bem distinta da rota que envolve medicamentos de uso humano. Os fármacos de uso humano chegam ao ambiente pelo sistema de esgotos. Outra particularidade é que a utilização de fármacos pelo homem é, em

geral, individualizada e altamente heterogênea dentro de uma população. Desse modo, embora o volume de uso dos fármacos venha aumentando década após década, há uma série de fatores de acabam por diluir, em termos relativos, a concentração destes resíduos no meio ambiente (Boxall et al., 2002; Boxall et al., 2006; Esiobu et al., 2002; Gavalchin and Katz, 1994).

Por outro lado, a utilização de RMVs na produção animal tem características bem distintas. Primeiramente, o objetivo primário é econômico e não terapêutico. Geralmente se busca obter ganho na taxa de conversão alimentar dos animais. Para tanto, diversas formulações são elaboradas de acordo com o tipo e fase de crescimento do animal (Booth and McDonald, 1992). Para tratamentos com este propósito, as doses são quase que invariavelmente ministradas em doses sub-terapêuticas, veiculadas na ração ou na água oferecida aos animais. Outra diferença muito significativa na administração de fármacos na produção animal, é que são ministrados simultaneamente para populações inteiras, em grupos que podem variar de dezenas (bovinos, eqüinos) até milhares de animais (aves). Esta opção é bastante óbvia, pelo fato dos animais muitas vezes permanecerem confinados do nascimento até o abate, especialmente no caso de suínos e aves, e que a transmissão de microorganismos entre animais em ambientes de confinamento é muito facilitada. A medicação individualizada é bem mais comum em bovinos e outros animais de grande porte. Na aqüicultura industrial, a administração de fármacos é realizada pela aplicação direta dos medicamentos nos tanques ou açudes. Aplicações tópicas de antiparasitários em rebanhos bovinos também são uma forma de liberação direta de fármacos ao ambiente, pelo efeito de lavagem que ocorre nos animais tratados (Blackwell et al., 2005; Capleton et al., 2006; Furusawa, 1998; Furusawa and Mukai, 1995; Kools et al., 2008).

Após a administração, os excrementos destes animais são muitas vezes recolhidos e utilizados como adubo na agricultura. Deste modo, os RMVs chegam de modo concentrado ao ambiente, onde poderão sofrer uma série de processos físico-químicos, dependendo da natureza do solo e das propriedades do fármaco, que fará com que estes resíduos atinjam diferentes níveis de concentrações em distintos nichos do ecossistema. Atualmente, os RMVs tem sido denominados como poluentes emergentes (Blackwell et al., 2004; Boxall, 2004; Boxall et al., 2004b; Capleton et al., 2006; Haller et al., 2002; Hamscher et al., 2005; Kay et al., 2005; Kolz et al., 2005; Kools et al., 2008; Kreuzig et al., 2005).

Para avaliar os efeitos potenciais dos RMVs para o ambiente e para a saúde humana, procedimentos de avaliação de riscos ambientais foram estabelecidos e implementados em muitas áreas. A Cooperação Internacional na Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Medicamentos Veterinários (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products / VICH SC) autorizou protocolo de decisão para a avaliação de risco dos medicamentos veterinários (VICH GL6, Phase I) e estabeleceu a harmonização de abordagens (VICH GL38, Phase II) para realização de avaliação de risco ambiental em nível internacional entre a União Européia, Japão, Estados Unidos, Canadá e Austrália / Nova Zelândia. Além disso, a VICH SC recentemente publicou guias de orientação de apoio à VICH GL6 e VICH GL38. A avaliação do impacto ambiental dos medicamentos veterinários também têm sido levada a cabo em muitos países (Acar and Moulin, 2006; Cooper et al., 2002; Lysons et al., 2007; Sommer, 1992; Spenser, 2004; Strong, 1992, 1993; Wassenaar, 2005).

No Brasil, o mercado de medicamentos veterinários é um dos maiores do mundo e encontra-se em franca expansão. A regulamentação deste mercado, desde os aspectos de registro e licença para produção até a análise fiscal, é exercida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Departamento de Fiscalização de Insumos e Produtos Agropecuários (DFIP) e de sua Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV). Os RMVs apresentam uma complexa rede de regulamentação que envolve vários órgãos dos Ministérios da Agricultura e da Saúde. Dois planos nacionais de controle de RMVs são executados. Um no âmbito do MAPA, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes, que se destina à análise de matérias-primas de origem animal e as amostras analisadas são oriundas dos estabelecimentos que possuem Serviço de Inspeção Federal (SIF). Um outro plano, o PAMVET, é levado a cabo pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), agência do Ministério da Saúde e possui foco em produtos acabados e coletados no comércio.

O uso de fármacos veterinários no Brasil é de difícil mensuramento, dado que não se encontram informações sobre quantidades comercializadas. Somente dados de volume de vendas são disponibilizados pelo sindicato das indústrias para a saúde animal (Sindan), que reúne a grande maioria das empresas do segmento farmacêutico-veterinário do Brasil. Dado o tamanho dos rebanhos nacionais, que se encontram entre os maiores do planeta, e o volume de vendas por grupos de fármacos, pode-se inferir que o consumo de fármacos veterinários e sua utilização como promotor de crescimento é bastante alta. Informações da indústria sobre custos de produção apontam os preços médios praticados no país para a produção de bovinos para os vinte antibióticos mais utilizados pelos produtores nos estados do Paraná e São Paulo. Os preços médios foram correlacionados com a quantidade em

gramas de antibiótico contida na apresentação cotada e foi obtido um preço médio de R\$ 1,053 para cada grama de antibiótico (princípio ativo). O universo de antibióticos constante na lista inclui diversos grupos como penicilinas, sulfonamidas, tetraciclina, anfenicóis, macrolídeos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas. Deste modo, extrapolando este custo médio para as demais formas de produção animal que não a bovinocultura e utilizando os dados de venda da indústria (tabelas 1, 2 e 3), podemos obter uma extrapolação para um volume de cerca de 480 mil toneladas de antibióticos de uso veterinário utilizados no ano de 2007 no Brasil. Este valor, embora seja uma aproximação bastante grosseira, nos dá uma visão da tendência de uso de fármacos veterinários no país. Para realizarmos uma comparação, em 2004, na Coreia do Sul, foram utilizadas aproximadamente 1400 toneladas de antibióticos de uso veterinário. No mesmo ano, foram utilizados cerca de 700 toneladas de antibióticos na produção animal na Inglaterra. Se considerarmos o valor estimado de 480 mil toneladas / ano no Brasil, ele é mais do que 340 vezes superior ao volume utilizado na Coreia do Sul e mais do que 600 vezes superior ao volume utilizado na Inglaterra em 2004.

Considerando as enormes lacunas existentes no que se refere a dados de utilização e frequência de fármacos veterinários, bem como os prováveis grandes volumes de fármacos liberados ao ambiente, é necessária a obtenção de dados confiáveis e precisos sobre a área. Levando também em conta o escasso conhecimento atual sobre as consequências da atuação de fármacos veterinários sobre os ecossistemas e a importância do monitoramento de RMVs em alimentos, faz-se necessário propor modos de classificação e priorização destes compostos baseados em seu uso, distribuição e perfil toxicológico, já que não existem hoje no Brasil regulamentações que orientem a este respeito. Alguns modelos têm sido propostos em diversos países, como modo de criar subsídios científicos para a

modelagem experimental de estudos de RMVs. Nesse âmbito, destaca-se o trabalho de Boxall e colaboradores (Blackwell et al., 2005; Boxall et al., 2006).

Recentemente, tem sido proposto que o grande depósito natural de genes de resistência à antibióticos seja o solo. Na análise metagenômica de solos, são encontrados genes capazes de expressar mecanismos de resistência bacteriana a uma gama muito ampla de microorganismos. A pressão evolutiva destes ambientes predispõe microorganismos a desenvolverem inúmeros sistemas de defesa contra substâncias antibióticas produzidas por organismos coexistentes bem como contra seu arsenal próprio de compostos com ação antibiótica. Na produção massiva de animais, há liberação de inúmeros fármacos excretados pela urina ou fezes destes animais no solo e nas águas. No atual estágio da pesquisa na análise de resíduos de antibióticos no ambiente, ainda não foi estimado com clareza que papel estes resíduos podem desempenhar no estímulo à expressão de genes ligados à resistência bacteriana presentes no metagenoma de solo e que até então permaneciam silenciados (Venter et al., 2004; Wright, 2007).

No presente estudo, nós utilizamos o exemplo das sulfonamidas, uma classe de compostos antibacterianos amplamente usada na medicina veterinária, para construção de um modelo propositivo para elencar prioridades na área de RMVs, seja sob o ponto de vista da presença de resíduos em alimentos como também no ambiente.

As sulfonamidas constituem a primeira classe de agentes anti-infecciosos descobertos na terapêutica. Esta classe de fármacos teve um uso intenso na era pré-penicilina e ainda durante muitas décadas após a introdução das penicilinas e demais classes de antibióticos.

Embora ainda hoje sejam fármacos de eleição para algumas situações clínicas muito bem determinadas, os mecanismos de surgimento de resistência fizeram com que as sulfonamidas - ou simplesmente sulfas - caíssem em desuso na medicina humana. Não obstante, seu uso ainda é muito freqüente na medicina veterinária, na área de produção animal, como profilático de infecções na produção em larga escala de aves e suínos, principalmente. Uma das principais vias de utilização é através de rações medicamentosas, que incluem, além das sulfas, diversos outros compostos em associação, mais comumente as penicilinas, tetraciclinas e agentes coccidiostáticos, principalmente do grupo dos ionóforos. As sulfonamidas são comercializadas na forma isolada ou formuladas em associações com outras sulfonamidas e/ou antibióticos e outros agentes antibacterianos. As sulfas possuem um amplo espectro de atividade bacteriostática, afetando bactérias gram negativas, gram positivas e alguns organismos protozoários.

A utilização destes fármacos na produção animal torna-se um grave problema de saúde pública quando não são observadas boas práticas de produção e os animais e os produtos originados destes, como ovos e leite, são destinados ao consumo humano sem a devida observação do tempo de retirada destes fármacos da dieta dos animais, antes de seu abate ou coleta de produtos derivados. A presença de resíduos de sulfas e de outros princípios ativos em alimentos pode gerar uma série de conseqüências de diferentes graus de risco, desde reações alérgicas em pessoas hipersensíveis até o surgimento de resistência microbiana passível de ser transferida para a microbiota humana normal. A dose subterapêutica, que é bastante comum quando se almeja o simples aumento da taxa de conversão alimentar, pode ainda afetar a homeostase entre microbiota e hospedeiro,

balanço que vem sendo sugerido como um dos fatores que regula e modula a resposta imune (D'Costa et al., 2006; Wright, 2007).

Diversos mecanismos regulatórios tem sido implantados por muitos países na tentativa de estabelecer monitoramento sobre a presença de resíduos de fármacos, pesticidas e contaminantes ambientais em produtos de origem animal e vegetal. Em outra frente, redes laboratoriais internacionais para monitoramento de resistência bacteriana em microorganismos veiculados por alimentos vem ganhando terreno. O problema impõe também necessidade de marcos regulatórios adequados na área de produção de rações para animais e, especialmente, na autorização e registro de fármacos para uso veterinário. No Brasil, embora estas quatro áreas – análise de resíduos, vigilância de mecanismos de resistência bacteriana, produção de rações e registro de medicamentos veterinários - estejam contempladas nos processos de vigilância e fiscalização estatal, a falta de compartilhamento de dados bem como a ausência de uma visão comum, implica em duplicidade de trabalhos e de ineficiência na produção de dados científicos que possam embasar tecnicamente a formulação de uma legislação mais adequada.

Com o propósito de regular esta modalidade de utilização de sulfas, o Brasil, assim como a maioria dos países produtores e importadores de alimentos, adota valores de limite máximo de resíduos para esta e outras classes de fármacos de uso comum na medicina veterinária. Atualmente, sendo o Brasil signatário do Codex Alimentarius, é adotado o valor máximo de resíduos de sulfas estabelecido por este organismo, que é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Este valor é estabelecido de forma semelhante em outros países.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC)

O MAPA é a autoridade responsável não só pelas análises laboratoriais do PNCRC, plano que monitora e avalia a presença de sulfas e inúmeros outros compostos em alimentos de origem animal e vegetal, mas também é responsável pelo registro de medicamentos de uso veterinário. A legislação foi recentemente atualizada e hoje é proposta uma série de condições para registro e renovação de registro de substâncias antimicrobianas. Estas ações visam principalmente selecionar o arsenal terapêutico disponível para o uso veterinário de maneira que não se provoque prejuízo à produção animal, mas levando em consideração a necessidade de se preservar o uso concomitante de antibióticos nas medicinas humana e veterinária (LEITE and JOKL, 1996).

O MAPA não disponibiliza, hoje, informações completas sobre quais tipos de fármacos e quantas apresentações farmacêuticas estão disponíveis, o que dificulta avaliação do panorama do mercado veterinário brasileiro. Também são raros os trabalhos que trazem dados de incidência e frequência de uso.

Mercado Veterinário Brasileiro

O mercado de produtos veterinários no Brasil é suprido por dois tipos característicos de empresas. Grandes multinacionais químico farmacêuticas, com atuação global, convivendo com pequenas empresas nacionais. As poucas exceções intermediárias estão sendo englobadas por estratégias de aquisições, reforçando o ambiente de consolidação por que passa o setor.

O processo de consolidação nos últimos anos tem sido intenso. Em 1990, 22 empresas respondiam por 70% do mercado mundial (na época de US\$ 9,2 bilhões). Em 1998 (US\$ 17,9 bilhões), a mesma fatia foi atingida por 17 empresas. No ano passado, 9 empresas responderam por 50% do mercado (em 1990, eram 12). No Brasil, a situação não é diferente. O mercado faturou em 1998, US\$ 860 milhões em um panorama onde 60% do mercado é dominado por 10 empresas, sendo que as multinacionais detém cerca de 70% do mercado. Para dados de crescimento deste mercado, consulte a tabela 3.

Os insumos veterinários podem ser divididos em dois grandes grupos. Por um lado, os chamados – equivocadamente - “genéricos”, produtos sem grandes barreiras tecnológicas à entrada, sem proteção intelectual, em geral presentes nos mercados com grande variedade de marcas. Por outro, as especialidades, produtos com atributos diferenciais, produzidos por poucas empresas e, em geral, voltados para mercados de nicho. Trata-se de um mercado muito segmentado. Os produtos, agrupados por categoria farmacêutica (biológicos, fármacos, e suplementos nutricionais), são destinados a diferentes segmentos animais (bovinos de carne, leite, suínos, aves, eqüinos, cães & gatos e outras espécies). Dentro desses segmentos, os produtos são destinados a diferentes tipos de clientes, divididos segundo o grau de tecnificação da produção.

Os objetivos específicos deste trabalho são elencar as sulfonamidas disponíveis no mercado veterinário brasileiro em 2007, e propor um sistema racional simples para priorização de fármacos a serem monitorados em alimentos bem como para estudos de impacto ambiental.

Material e Métodos

A pesquisa dos medicamentos de uso veterinário contendo sulfas foi realizada através de revisão bibliográfica, análise de bulas e rótulos, pesquisa através da Internet e em bancos de dados oficiais do MAPA e pesquisa em casas de comércio agropecuário.

Resultados e Discussão

No ano de 2007, estavam disponíveis no Brasil 118 medicamentos de uso veterinário contendo sulfonamidas (figura 1). Os dados destes medicamentos foram tabelados e suas características analisadas em conjunto e separadamente. Foram analisados os seguintes fatores: sulfonamida(s) presente(s) na formulação; concentração dos princípios ativos; outros fármacos associados; forma farmacêutica; espécies animais com indicação de uso; período de carência para uso em animais produtores de alimentos.

As sulfonamidas mais frequentes foram sulfadiazina (27,12%), sulfametazina (13,56%), sulfametoxazol (12,71%), ftalilsulfatiazol (11,02%), sulfaquinoxalina (11,02%), sulfanilamida (10,17%), sulfaguanidina (7,63%), sulfaclorpiridazina (4,24%), sulfadimetoxina (4,24%) e outras (13,56%) (tabela 4)

As concentrações do princípio ativo na forma farmacêutica variaram desde 0.1% (sulfadiazina de prata em spray) até 80% (sulfadiazina em pó para uso oral).

As associações medicamentosas representaram 89% do total (105 apresentações), sendo que 13,5% das associações são de múltiplas sulfas (14 apresentações). Dentre fármacos de outras classes, a associação mais utilizada é com trimetoprim (57 apresentações; 54,3% das associações). Em seguida, aparecem a clortetraciclina, diaveridina, estreptomicina e neomicina (tabela 5).

As formas farmacêuticas mais freqüentes foram pó para uso oral (37,3%), solução oral (21,2%), injetáveis (17,8%) e suspensão oral (9,3%). As indicações de uso das 118 apresentações abrangem praticamente todas as espécies animais produtoras de alimento (com exceção de pescado) bem como de animais de estimação (pets). O período de carência para retirada da medicação em animais produtores de alimentos foi analisado com base em estudo de bulas. Os períodos variam enormemente, mesmo para formas farmacêuticas semelhantes. Muitas bulas não apresentam nenhuma informação referente à período de carência, mesmo em casos onde o medicamento seja indicado para espécies produtoras de alimentos.

Poucos países tem hoje sistemas eficientes e confiáveis de levantamento de dados sobre uso de antibióticos na produção animal (Kools et al., 2008). Dada a ausência de dados sobre uso de sulfonamidas na produção animal brasileira, podemos considerar em termos razoáveis que das supostas 480 mil toneladas de antibióticos (aqui incluídas as sulfas, embora não sejam farmacologicamente classificáveis como tal), 10% deste total seriam de sulfas. Ou seja, aproximadamente 48 mil toneladas de sulfonamidas teriam sido utilizadas em 2007.

Crêterios de pontua o numérica simples são utilizados atribuindo valores a determinados parâmetros que devem ser observados para elencar em escala de prioridades os fármacos que devem ser a) monitorados dentro de um Plano Nacional de Controle de Resíduos em Alimentos e b) avaliados quanto ao seu impacto na microbiota de solo e mananciais de  gua. Para as sulfas, podemos observar que o potencial de permanência de resíduos em alimentos   diretamente proporcional ao período de permanência do fármaco no organismo ($t_{1/2}$ vida) e inversamente proporcional   extensão do processo de metaboliza o do fármaco. Deste modo, para o sulfatiazol, que geralmente   utilizado na forma de pr -fármaco (ftalilsulfatiazol) para que exerça atividade somente na luz intestinal e seja excretado de forma inalterada e com absor o desprez vel, o potencial de permanência de resíduos em alimentos   bastante baixo. Não obstante, para avalia es do impacto ambiental de resíduos de sulfas, estas rela es devem ser todas elas invertidas; assim, o sulfatiazol, sendo largamente excretado em curto intervalo de tempo, possui preocupante papel na migra o de fármacos ao ambiente.

Baseado na proposta de pontua o que consta na tabela 6, as sulfas foram elencadas de acordo com sua pontua o para estudos de permanência de resíduos em alimentos. Estes resultados são computados na tabela 7. Embora alguns dados farmacológicos sejam bem consistentes, ainda restam muitas lacunas de informa es que permitam uma aplica o menos empírica da proposta. Dados de comercializa o, por exemplo, não puderam ser utilizados por serem praticamente inexistentes. Informa es toxicológicas têm existido somente para alguns compostos. A ferramenta proposta necessita de diversos dados para que possa fornecer predi es mais robustas e confiáveis. Conclui-se que a comunidade científica brasileira e o público em geral necessitam com urgência ter acesso transparente a

informações sobre o real cenário da utilização de fármacos de uso veterinário no Brasil, de modo a poder avaliar corretamente o impacto ambiental causado.

Conclusões

1. Não estão disponíveis dados sobre o consumo de fármacos de uso veterinário no Brasil que permitam estabelecer critérios técnicos objetivos para subsidiar a regulamentação e a pesquisa científica.
2. Pode-se inferir que o consumo de fármacos de uso veterinário na produção animal brasileira é um dos maiores do mundo e que a questão dos RMVs inspira maiores atenções seja por parte do setor público como da comunidade científica nacional.

Referências

ACAR, J.F., MOULIN, G., 2006. Antimicrobial resistance at farm level. OIE Revue Scientifique et Technique 25, 775-792.

ANADON, A., ARNOLD, D., BOISSEAU, J., BOOBIS, A.R., ELLIS, R., GREENLEES, K., MCLEAN, J.G., MACNEIL, J., ROJAS MARTINEZ, J.L., MITEMA, E.S., PALERMO-NETO, J., SOBACK, S., STEPHANY, R.W., 2002. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. World Health Organization - Technical Report Series.

ANADON, A., ARNOLD, D., BOOBIS, A., ELLIS, R., FERNANDEZ SUAREZ, A., GREENLEES, K., MACNEIL, J., MCLEAN, J.G., PALERMO-NETO, J., ROJAS MARTINEZ, J.L., SANDERS, P., SWAN, G.E., WONGTAVATCHAI, J., BRUNO, A., CERNIGLIA, C.E., DE LOURDES COSTARRICA, M., FRIEDLANDER, L.G., ISEKI, N., JEONG, S.H., LEWICKI, J., MCEWEN, S., OZAWA, S., REEVES, P., RITTER, L., ROBERTS, G., SHEFFER, M., SUNDLOF, S., TRITSCHER, A., WENBERG, A., 2006. Sixty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization - Technical Report Series, pp. 1-80.

BLACKWELL, P.A., BOXALL, A.B.A., KAY, P., NOBLE, H., 2005. Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 2192-2201.

BLACKWELL, P.A., LUTZHOFT, H.C.H., MA, H.P., HALLING-SORENSEN, B., BOXALL, A.B.A., KAY, P., 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. Talanta 64, 1058-1064.

BLOOM, R., 2004. Use of veterinary pharmaceuticals in the United States. Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects, and Risks.

BOOTH, N.H., MCDONALD, L.E., 1992. Farmacologia e terapêutica em veterinária. Guanabara Koogan Rio de Janeiro.

BOXALL, A.B.A., 2004. The environmental side effects of medication - How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health? Embo Reports 5, 1110-1116.

BOXALL, A.B.A., BLACKWELL, P., CAVALLO, R., KAY, P., TOLLS, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. Toxicology Letters 131, 19-28.

BOXALL, A.B.A., FOGG, L.A., BLACKWELL, P.A., KAY, P., PEMBERTON, E.J., CROXFORD, A., 2004a. Veterinary medicines in the environment. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 180 180, 1-91.

BOXALL, A.B.A., FOGG, L.A., PEMBERTON, E.J., KOLPIN, D.W., BAIRD, D.J., 2004b. Prioritization, modeling and monitoring of veterinary medicines in the UK environment. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 228, U617-U617.

BOXALL, A.B.A., JOHNSON, P., SMITH, E.J., SINCLAIR, C.J., STUTT, E., LEVY, L.S., 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2288-2297.

BOXALL, A.B.A., KOLPIN, D.W., HALLING-SORENSEN, B., TOLLS, J., 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science & Technology* 37, 286A-294A.

BRASIL, 2000. Normas e Padroes de Nutrição e Alimentação Animal, revisao 2000. In: da Agricultura, P.e.A.M.S.D. (Ed.), Brasília, pp. 17-33.

CAMPAGNOLO, E.R., JOHNSON, K.R., KARPATI, A., RUBIN, C.S., KOLPIN, D.W., MEYER, M.T., ESTEBAN, J.E., CURRIER, R.W., SMITH, K., THU, K.M., MCGEEHIN, M., 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment* 299, 89-95.

CAPLETON, A.C., COURAGE, C., RUMSBY, P., HOLMES, P., STUTT, E., BOXALL, A.B.A., LEVY, L.S., 2006. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicology Letters* 163, 213-223.

COOPER, C., SHERRATT, T., BOXALL, A., 2002. Modelling the impact of residues of ectoparasiticides and endoparasiticides in livestock dung on populations of dung flora and fauna: Phase 1. Report to English Nature.

D'COSTA, V.M., MCGRANN, K.M., HUGHES, D.W., WRIGHT, G.D., 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374-377.

ESIObU, N., ARMENTA, L., IKE, J., 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Health Research* 12, 133-144.

FLOATE, K.D., SPOONER, R.W., COLWELL, D.D., 2001. Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. *Medical and Veterinary Entomology* 15, 117-120.

FURUSAWA, N., 1998. Absorbability of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine administered via food of laying hens. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 45, 267-269.

FURUSAWA, N., MUKAI, T., 1995. Transfer of dietary sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine into various tissues of laying hens. *British poultry science* 36, 313-316.

GAVALCHIN, J., KATZ, S.E., 1994. The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *J AOAC Int* 77, 481-485.

HALLER, M.Y., MULLER, S.R., MCARDELL, C.S., ALDER, A.C., SUTER, M.J.F., 2002. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952, 111-120.

HAMSCHER, G., PAWELZICK, H.T., HOPER, H., NAU, H., 2005. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 861-868.

KAY, P., BLACKWELL, P.A., BOXALL, A.B.A., 2005. A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data. *Environmental Pollution* 134, 333-341.

KOLPIN, D.W., FURLONG, E.T., MEYER, M.T., THURMAN, E.M., ZAUGG, S.D., BARBER, L.B., BUXTON, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202-1211.

KOLZ, A.C., MOORMAN, T.B., ONG, S.K., SCOGGIN, K.D., DOUGLASS, E.A., 2005. Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons. *Water Environment Research* 77, 49-56.

KOOLS, S.A.E., MOLTMANN, J.F., KNACKER, T., 2008. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50, 59-65.

KREUZIG, R., HOLTGE, S., BRUNOTTE, J., BERENZEN, N., WOGRAM, J., SCHULZ, R., 2005. Test-plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 777-781.

LEITE, M.P.M.B., JOKL, L., 1996. Ocorrência de resíduos de sulfonamidas em produtos cárneos de frigoríficos inspecionados pelo MAARA, de 1990-1994. . *Boletim Soc Bras Ciência Tecnologia Alimentos*, p. 81-86.

LYSONS, R.E., GIBBENS, J.C., SMITH, L.H., 2007. Progress with enhancing veterinary surveillance in the United Kingdom. *Veterinary Record* 160, 105-112.

MCCRACKEN, D.I., FOSTER, G.N., 1993. The effect of ivermectin on the invertebrate fauna associated with cow dung. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 73-84.

RENAUD, F.G., BOXALL, A.B.A., TOY, R., ROBERTSON, S., 2004. Evaluation of approaches for terrestrial hazard classification. *Chemosphere* 57, 1697-1706.

SCOTT TEETER, J., MEYERHOFF, R.D., 2003. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research* 93, 45-51.

SOMMER, C., 1992. Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: concentrations and impact on dung fauna. *Bulletin of Entomological Research* 82, 257-264.

SPENSER, E.L., 2004. Compounding, extralabel drug use, and other pharmaceutical quagmires. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 13, 16-24.

STRONG, L., 1992. Avermectins: a review of their impact on insects of cattle dung. *Bulletin of Entomological Research* 82, 265-274.

STRONG, L., 1993. Overview: The impact of avermectins on pastureland ecology. *Veterinary Parasitology* 48, 3-17.

STRUCINSKI, P., GORALCZYK, K., CZAJA, K., HERNIK, A., KORCZ, W., LUDWICKI, J.K., 2007. Consumer risk assessment in case of maximum residue levels (MRLs) violations in food. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 58, 377-388.

VENTER, J.C., REMINGTON, K., HEIDELBERG, J.F., HALPERN, A.L., RUSCH, D., EISEN, J.A., WU, D., PAULSEN, I., NELSON, K.E., NELSON, W., FOUTS, D.E., LEVY, S., KNAP, A.H., LOMAS, M.W., NEALSON, K., WHITE, O., PETERSON, J., HOFFMAN, J., PARSONS, R., BADEN-TILLSON, H., PFANNKOCH, C., ROGERS, Y.H., SMITH, H.O., 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66-74.

WALL, R., STRONG, L., 1987. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature* 327, 418-421.

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

WRIGHT, G.D., 2007. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 5, 175-186.

YANG, S., CARLSON, K., 2003. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research* 37, 4645-4656.

ZILLES, J., SHIMADA, T., JINDAL, A., ROBERT, M., RASKIN, L., 2005. Presence of macrolide-lincosamide-streptogramin B and tetracycline antimicrobials in swine waste treatment processes and amended soil. *Water Environment Research* 77, 57-62.

Figura 1. Número de apresentações por sulfonamida. Dados se referem ao ano de 2007.

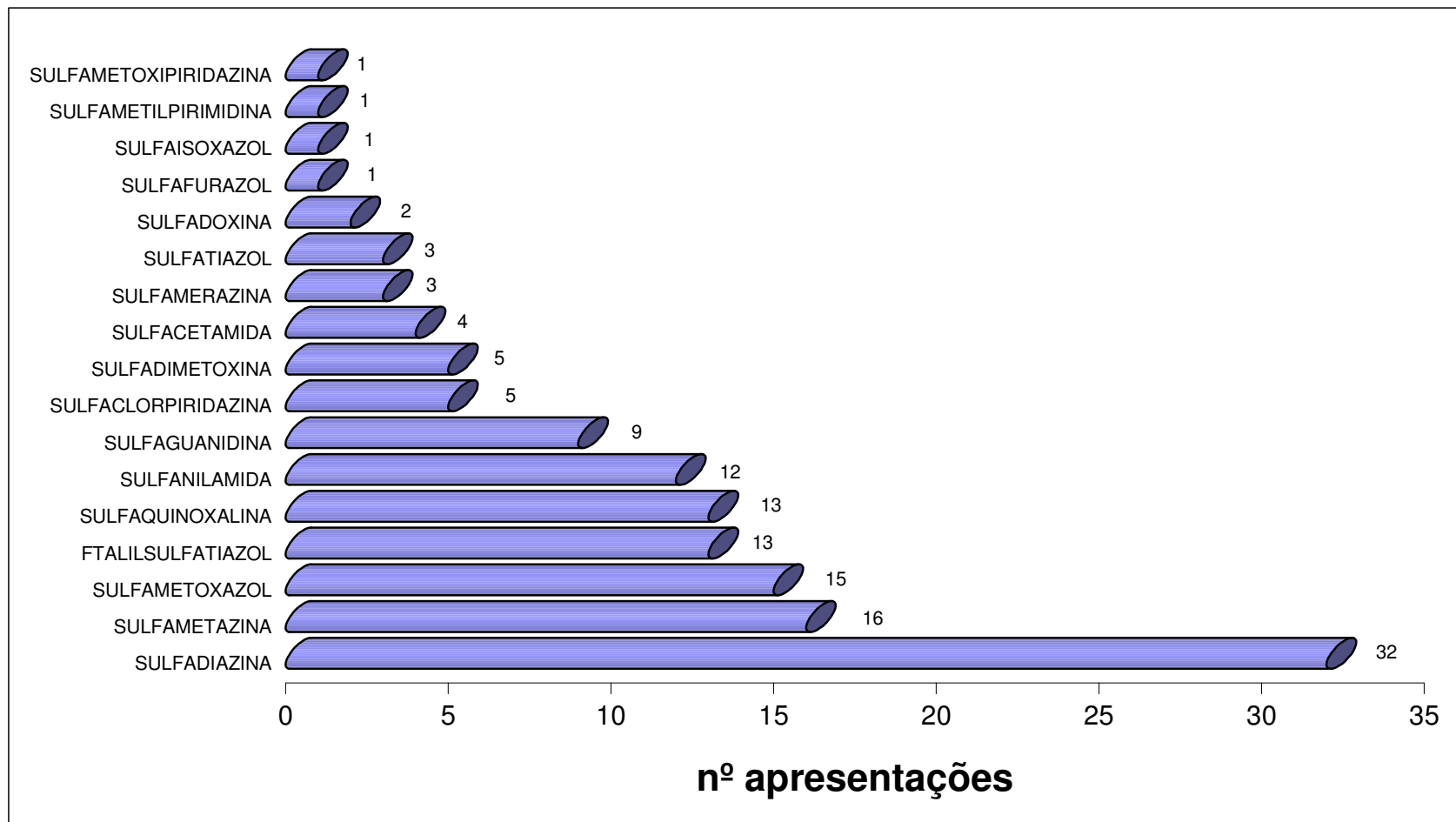


Tabela 1. Faturamento do mercado veterinário brasileiro

| Ano | US\$ |
|------------|------------------|
| 2007 | 1.252.364.330,00 |
| 2006 | 1.038.963.921,00 |
| 2005 | 889.800.970,00 |
| 2004 | 690.273.542,00 |

Tabela 2. Faturamento do mercado veterinário brasileiro em 2007 por classe de fármaco

| Classe Terapêutica | R\$ |
|--------------------|----------------|
| ANTIMICROBIANOS | 509.411.943,00 |
| ANTIPARASITÁRIOS | 834.129.118,00 |
| BIOLÓGICOS | 739.244.168,00 |
| OUTROS | 356.695.250,00 |

Tabela 3. Faturamento do mercado veterinário brasileiro em 2007 por espécie animal

| Espécie | R\$ |
|------------|------------------|
| RUMINANTES | 1.445.755.335,00 |
| AVES | 322.528.689,00 |
| SUÍNOS | 292.343.812,00 |
| PETS | 285.249.677,00 |
| EQUINOS | 70.534.803,00 |
| OUTROS | 23.068.163,00 |

Tabela 4. Perfil das apresentações de sulfas no Brasil em 2007.

| SULFONAMIDA | APRESENTAÇÕES | FORMAS FARMACÊUTICAS | | | | | | | | | | total | % |
|-----------------------|---------------|----------------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| | | INJ | SOL | SUS | PÓ | POM | CMP | INF | ERR | PRE | OUT | | |
| SULFADIAZINA | 32 | 7 | 2 | 6 | 9 | 1 | 1 | 1 | --- | 3 | 2 | 32 | 23,53 |
| SULFAMETAZINA | 16 | 3 | 3 | 1 | 2 | --- | 1 | --- | 1 | 5 | --- | 16 | 11,76 |
| SULFAMETOXAZOL | 15 | 3 | 4 | 1 | 5 | --- | 2 | --- | --- | --- | --- | 15 | 11,03 |
| FTALILSULFATIAZOL | 13 | --- | 2 | 1 | 9 | --- | --- | --- | --- | --- | 1 | 13 | 9,56 |
| SULFAQUINOXALINA | 13 | --- | 8 | --- | 4 | --- | --- | --- | --- | 1 | --- | 13 | 9,56 |
| SULFANILAMIDA | 12 | --- | --- | --- | --- | 9 | --- | 1 | 1 | --- | 1 | 12 | 8,82 |
| SULFAGUANIDINA | 9 | --- | 1 | 1 | 6 | --- | 1 | --- | --- | --- | --- | 9 | 6,62 |
| SULFACLORPIRIDAZINA | 5 | --- | 2 | --- | 3 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 5 | 3,68 |
| SULFADIMETOXINA | 5 | 2 | 1 | --- | 1 | --- | 1 | --- | --- | --- | --- | 5 | 3,68 |
| SULFACETAMIDA | 4 | 2 | 1 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1 | 4 | 2,94 |
| SULFAMERAZINA | 3 | --- | --- | --- | 3 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 3 | 2,21 |
| SULFATIAZOL | 3 | 1 | --- | 1 | --- | --- | 1 | --- | --- | --- | --- | 3 | 2,21 |
| SULFADOXINA | 2 | 1 | 1 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 2 | 1,47 |
| SULFAFURAZOL | 1 | --- | --- | --- | 1 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1 | 0,74 |
| SULFAISOXAZOL | 1 | --- | --- | --- | 1 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1 | 0,74 |
| SULFAMETILPIRIMIDINA | 1 | 1 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1 | 0,74 |
| SULFAMETOXIPIRIDAZINA | 1 | 1 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1 | 0,74 |
| total | 136 | 21 | 25 | 11 | 44 | 10 | 7 | 2 | 2 | 9 | 5 | 136 | |
| porcentagem | 100,00 | 15,4 | 18,4 | 8,1 | 32,4 | 7,4 | 5,1 | 1,5 | 1,5 | 6,6 | 3,7 | | |

INJ – INJETÁVEL (SOLUÇÃO OU SUSPENSÃO)
 SOL – SOLUÇÃO DE USO ORAL
 SUS – SUSPENSÃO DE USO ORAL
 PÓ – PÓ PARA USO ORAL, VEICULADO PELA ÁGUA
 POM – POMADA
 CMP – COMPRIMIDO
 INF – INFUSÃO INTRAMAMÁRIA
 ERR – ERRINO
 PRE – PREMIX, PARA PREPARAÇÃO DE RAÇÃO MEDICAMENTOSA
 OUT – OUTROS (COLÍRIO, VELAS, ETC)

Tabela 5. Perfil das associações medicamentosas contendo sulfas

| Associação | Nº de apresentações | % das associações | % do total |
|---------------|---------------------|-------------------|------------|
| Duas sulfas | 11 | 10,48 | 9,32 |
| Três sulfas | 1 | 0,95 | 0,85 |
| Quatro sulfas | 2 | 1,90 | 1,69 |
| Trimetoprim | 57 | 54,29 | 48,31 |
| Outras | 34 | 32,38 | 28,81 |

Tabela 6. Proposta de critérios de pontuação para priorização de sulfonamidas

| Critério | Pontuações | Alimentos | Ambiente | Peso |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------|----------|------|
| Número de apresentações disponíveis: um grande número de apresentações pode ser levado em conta como um indicador subjetivo de “popularidade” do fármaco embora se necessitem de dados de uso e volume de vendas por substância para racionalizar devidamente o processo | >30 | 5 | 5 | 1 |
| | 20-30 | 4 | 4 | |
| | 10-20 | 3 | 3 | |
| | 05-10 | 2 | 2 | |
| | <05 | 1 | 1 | |
| Espécies indicadas: de acordo com a(s) espécie(s) em que o fármaco é utilizado, tem-se um perfil de manejo e administração que é de extrema relevância para o potencial de resíduos ou impacto ambiental | Aquacultura | 5 | 5 | 3 |
| | Tratamento coletivo | 4 | 4 | |
| | Tratamento individual | 3 | 3 | |
| | PETs | 3 | 3 | |
| Dados farmacológicos: substâncias de baixa absorção, destinadas à efeito na luz intestinal, como o sulfatiazol, por exemplo, tem baixo potencial de resíduos em alimentos, mas alto índice para avaliação de impacto ambiental | Baixa metab. | 3 | 3 | 2 |
| | Média metab. | 2 | 2 | |
| | Alta metab. | 1 | 1 | |
| | Ação curta | 1 | 4 | 2 |
| | Ação intermediária | 2 | 3 | |
| | Ação longa | 3 | 2 | |
| | Ação ultra-longa | 4 | 1 | |
| Forma farmacêutica: dependendo da forma farmacêutica, há maior ou menor probabilidade de permanência do fármaco em tecidos | Injetáveis | 5 | 2 | 1 |
| | Rações | 4 | 3 | |
| | Solução oral | 4 | 3 | |
| | Errinos, pomadas | 1 | 2 | |
| Genotoxicidade e teratogenicidade | Alto ou desconhecido | 5 | 5 | 3 |
| | Médio | 4 | 4 | |
| | Baixo | 3 | 3 | |
| | Insignificante | 1 | 1 | |
| Potencial alergênico | Alto ou desconhecido | 5 | 5 | 2 |
| | Médio | 4 | 4 | |
| | Baixo | 3 | 3 | |
| | Insignificante | 1 | 1 | |

Tabela 7. Pontuação das sulfonamidas de acordo com os critérios propostos

| Critério | SDZ | STZ | SMZ | SMA | SQX | SFA | SGD | SCP | SDMX | SCA | SMR | SDX | PESO |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|
| Apresentações | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Indicações | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 |
| Farmacologia (metab.) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| Farmacologia (1/2 vida) | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 4 | 2 |
| Forma farmacêutica | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 1 |
| Genotoxicidade Teratogenicidade | 1 | 5 | 5 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 |
| Alergenicidade | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| Total | 40 | 48 | 52 | 36 | 44 | 33 | 35 | 37 | 35 | 36 | 40 | 41 | |

Capítulo II – Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis.

Este manuscrito foi submetido à publicação no periódico *Journal of Separation Science* e apresenta uma revisão da análise de sulfonamidas por eletroforese capilar, dando ênfase aos métodos utilizados em amostras de alimentos.

Rodrigo Hoff^{1,2}
Tarso B. L. Kist^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Porto Alegre, RS, Brazil

³Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Review

Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis

The methods of analysis of sulfonamides (SFAs) using CE are reviewed. Sulfonamides were the first antimicrobial group of drugs used in medical treatment. These compounds are still used today in medicine and widely are employed in veterinary medicine, also for their growth promoter effects. Improved methods of analysis of sulfonamides are a constant challenge for researchers. CE is a new trend in the fields of pharmaceutical and food analyses. Several methods for the determination of SFAs by CE have been published in recent years, and the present review considers applications in quality control of pharmaceutical dosage forms, food analysis, determinations in serum, and other biological fluids as well as in electrophoresis experiments which examine the behavior of this class of compounds for theoretical studies of the technique. This review covers studies ranging from the pioneering works on sulfonamide analyses using classical electrophoresis to the more recent CE methods coupled to tandem mass spectrometers. The sections are divided following the EC modes like CZE, MEKC, and hyphenated methods (CE-MS, CE-MS/MS). A brief compilation of theoretical findings of sulfonamides electrophoretic behavior is also included. Parameters such as recoveries, LOD and LOQ, among others, are examined, covering works published until August 2008. This review can contribute to further research aimed to improve the analysis of SFAs by CE.

Keywords: Capillary electrophoresis / Food analysis / Pharmaceutical analysis / Residues / Sulfonamides

Received: December 17, 2008; revised: December 30, 2008; accepted: December 30, 2008

DOI 10.1002/jssc.200800738

1 Introduction

The discovery of antibacterial activity of sulfas was achieved in 1935 with the publication of the study “A Contribution to Chemotherapy of Bacterial Infections” [1], in which the biological activity of *p*-sulfamidocrisoidine (prontosil rubrum) was described by the pathologist and bacteriologist Gerhardt Domagk. This substance had been synthesized in 1932 by Fritz Mietsch and Joseph Klarer, ascited by Mitsunashi [2] and Miert [3], based on the classic chemistry of textile dyes, specifically to be tested as antibacterial agent. The credit for this discovery gave Domagk the Nobel Prize of Medicine in 1939 [4].

After these years, other emerging antimicrobial substances were obtained, some synthetically and others iso-

lated from microorganisms, such as penicillin, discovered by Fleming in 1928, which showed high bactericidal action [3].

Forneau and coworkers, analyzing metabolites in blood and urine of patients treated with prontosil, detected the presence of sulfanilamide (substance known since 1908) [3]. Through this study, they found that the active part of the molecule was the sulfanilamide group, and that the various chemotherapeutic antibacterial hitherto well known, only acted because of the presence of the sulfonamidic pharmacophoric group, whose mechanism of action was subsequently clarified and related to the inhibition of the bacterial enzyme dihydropteroate synthase.

From the end of the 1940s on, antibiotics tended to replace sulfas in chemotherapy because of their lower toxicity and broader spectrum of action [5].

After the observation that certain bacteria developed resistance to antibiotics, new interest in sulfas grew, and a search for new sulfonamidic derivatives began, encouraged by the ease of production and low inherent costs.

Today, some sulfas are used as associations, e.g., sulfamethoxazole and trimethoprim (TMP), for enhanced antibiotic effects [6]. Moreover, new drugs have been

Correspondence: Rodrigo Hoff, LANAGRO/RS, Estrada da Ponta Grossa no 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS, Brazil
E-mail: rodrigo.hoff@agricultura.gov.br
Fax: +55-51-3248-2690

Abbreviations: ADI, acceptable daily intake; CFS, continuous flow system; DAD, diode array detector; DHFR, dihydrofolate reductase; LVSS, large-volume sample stacking; MRL, maximum residue limit; PLE, pressurized liquid extraction; SDMX, sulfadimethoxine; SMZ, sulfamethazine; TMP, trimethoprim

derived from sulfa and are quite promising as anticancer and antiviral drugs [7].

Recently, new applications have been demonstrated for sulfas, as well as new discoveries about their action mechanism [8].

Despite the relative loss of importance in human medicine, sulfonamides are widely used in developing countries as basic medications, especially for urinary infections. The class of drugs is also used to defeat *Plasmodium falciparum*, the causative agent of malaria, and an association of sulfadoxine and pyrimethamine is widely used in affected zones [9].

Commonly, sulfonamides are used in food-producing animals to prevent diseases, to promote growth, to increase weight gain, and to reduce the amount of feed *per* animal, which ultimately increases food conversion rates. They are administered in feed at sub-therapeutic doses during growth. The incorrect administration of antibiotics in veterinary medicine imposes the great potential risk that the residues of these drugs may be present in edible tissue [10].

The main risk to human health in using antibiotics on animals is the fact that animal bacteria can develop resistance to drugs, mainly by using sub-therapeutic doses. This resistance can develop through several pathways such as mutation, acquisition of resistant genes or a combination of both [11].

Another major concern about the massive use of sulfonamides and other drugs in intensive animal production is the residue amount that is transferred to the environment through animal waste [12]. This subject has recently received increasing attention due to the fact that it may be involved in the selective upregulation of the so-called resistome of soil microorganisms [13, 14].

In several countries, consumer exposure to residues was estimated through studies of the normal diet of an individual, by international agencies as World Health Organization (WHO) or Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). These studies measured the population's exposure to certain residues present in food. These data allowed to calculate the consumers' average exposure to a range of chemical compounds present in diets and to interpret the average exposure in terms of an acceptable daily intake (ADI) to these substances. ADI is an estimate of the quantity of the substance that can be ingested daily throughout life without appreciable risk to health [15]. According to international boards as Codex Alimentarius, all active compounds – new or existing – used in veterinary medicines for food-producing animals require the establishment of a maximum residue limit (MRL). MRLs are based on the concept of ADI, but are determined taking into account the depletion of the drug in the target species, so its values can be established for tissues and animal products [16]. Due to pharmacokinetic differences between species, MRL is spe-

cific to each species, while ADI is universal for a given substance.

Residue analysis is an important element in food safety and public health policies, as it establishes parameters that inform whether a food is safe or not for human consumption. For drugs used in animal production, the analysis of their residues is a vital component of programs and monitoring plans implemented by regulatory agencies in virtually the entire world. The tests are aimed at determining whether residues are within acceptable levels for consumption, which means levels below MRL. Hence the importance of developing analytical procedures to determine sulfonamides in biological matrices in low levels, as MRLs.

Residues analysis methods have enjoyed enormous progress since the 1980s. There were many scientific advances in the field of analytical equipment, computerization, and automation of all method's stages. Many of these achievements have been directed to increase the sensitivity and specificity of techniques. The demand for regulatory control of chemical contaminants in food expanded dramatically in the last decade, making residue regulation an important factor to be considered in international commodities trade.

All this has generated a great demand for analytical methods to detect veterinary drug residues in food matrices. Here, the chromatographic techniques have played the most prominent role, especially in HPLC. This versatile tool has been widely studied and is commonly used in sulfonamides analysis in several types of matrices [17–23]. HPLC is capable to detect low concentration levels, which is the key in residues analysis. However, as a technique HPLC is sometimes limited by the low efficiency of separation, excessive spending with columns and consumption of relatively high quantities of buffer solutions and organic solvents.

CE is an adequate alternative to chromatographic techniques, mainly when only small sample amounts are available [24–26]. Some advantages of CE are the high separation efficiency, the possibility to analyze several samples simultaneously in multicapillary systems, the low consumption of reagents and accessories (packaged columns are not required), apart from the fact that CE hardly makes the use of solvents with high environmental and toxicological impact.

CE – as HPLC – allows automation, injection of smaller volumes of samples and multiple modes of detection. CE is used for tracking drugs in a variety of matrices such as plasma and tissue, and has been studied in several works for a variety of biological samples [26, 27]. For these reasons, CE is an analytical tool that has won importance and today broadens its scope of applications, mainly in the food and drug analysis areas.

Several CE methods for sulfonamides analysis have been published in the past 40 years. The continuous

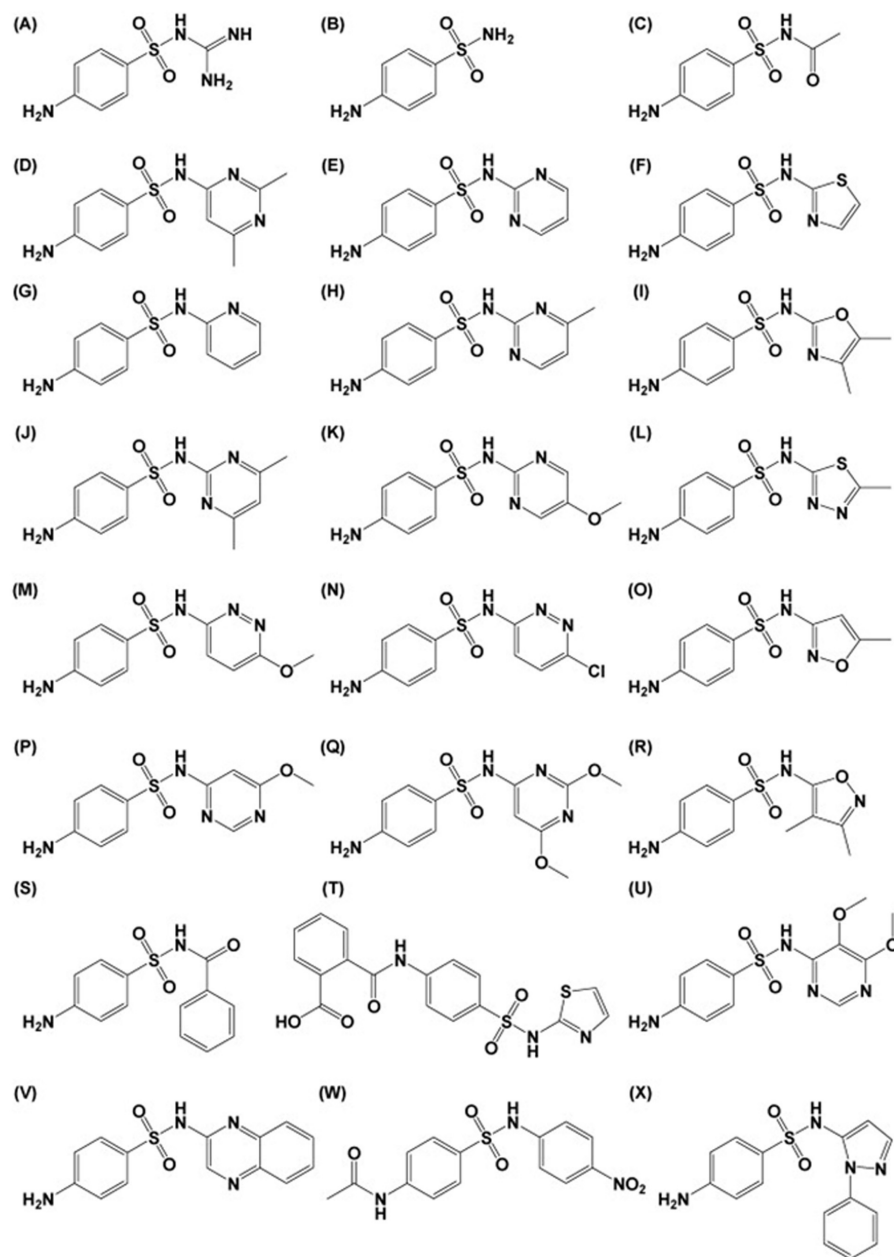


Figure 1. Chemical structures of the most common sulfonamides: (A) sulfaguanidine (SGD), (B) sulfanilamide (SFA), (C) sulfacetamide (SAA), (D) sulfisomidin (SIM), (E) sulfadiazine (SDZ), (F) sulfathiazole (STZ), (G) sulfapyridine (SPY), (H) sulfamerazine (SMR), (I) sulfamoxole (SMO), (J) sulfamethazine (SMZ), (K) sulfamether (SME), (L) sulfamethizole (SMT), (M) sulfamethoxyypyridazine (SMP), (N) sulfachloropyridazine (SCP), (O) sulfamethoxazole (SMA), (P) sulfamonomethoxine (SMM), (Q) sulfadimethoxine (SDMX), (R) sulfisoxazole (SSA), (S) sulfabenzamide (SB), (T) *N*^f-phthalylsulfathiazole (PST), (U) sulfadoxin (SDO), (V) sulfaquinoxaline (SQX), (W) sulfanitran (SNT), and (X) sulfaphenazole (SNZ).

improvement of these methods was observed together with the development of CE, and the applications migrated from classic electrophoresis to modern CE modes, like CZE, MEKC, CEC, and CE-MSn.

The present work covered methods and studies that made the use of sulfonamides, published from 1968 to may 2008, classified for type of electrophoresis, and chronological order within types. Figure 1 gives the structures of the most common sulfonamides.

2 Electrophoretic methods for the analysis of sulfonamides

2.1 Classical electrophoresis methods

The first reported work on sulfonamides analysis by electrophoresis was issued in 1968. In that study, Rashkovan and Sementovskaia [28] described a quantitative and qualitative method based on paper electrophoresis.

In 1974, Lepri *et al.* [29] published a study about the chromatographic and electrophoretic behavior of sulfonamides using thin layer of ion exchangers. Fourteen sulfa drugs and five N4-derivatives were analyzed by strong and weak cation and anion exchanges with polystyrene, paraffin, and cellulose matrices. Several solvents and mixtures of aqueous and organic solvents were tested. Electrophoretic behavior was evaluated on a BioRad AG 1-X4 (CH_3COO^-) and silica gel layers. For both chromatographic and electrophoretic behavior, the mobility of sulfonamides depends on their degree of dissociation of the conjugated acid, which in turn is dependent on the protonic activity of the solvents.

A decade after, an electrophoresis method was applied for the first time for antibiotic identification in food samples. Lott *et al.* [30] developed a very interesting method based on a combination microbiologic–electrophoretic assay. This method was applied for meat, milk, and animal feed samples. Using a high-voltage electrophoresis method which followed a microbiological screening assay, they could detect β -lactams antibiotics and sulfonamides in those food samples.

Briefly, meat and feed samples were extracted with an ACN–water mixture, and milk samples were examined directly after the same ACN–water extraction procedure.

After application of extracts onto plates of antibiotic medium no. 1 or nutrient agar, both seeded with sensitive microorganisms, positive samples produced inhibition zones. These samples were applied, for confirmatory purposes, to 10 mm diameter wells on electrophoretic plates (60 cm \times 40 cm), with a gel depth of 1.6 mm. The support medium was 1% agar and 1% agarose in Tris/succinic acid buffer pH 6 and 8. A voltage of 1500 V was applied for 1.5 h at 15°C. Following electrophoresis, the migrated compounds were visualized by over-layering with antibiotic media no. 1, pH 6 or 8, seeded with *Micrococcus luteus* or *Bacillus cereus* spore suspension and the plates were incubated for 18–24 h at 30°C.

In 1988, another study on electrophoretic behavior of sulfonamides was reported [31]. In that work, the authors determined the *pI*s of sulfadiazine, sulfafurazole, and sulfapyridine by microelectrophoresis as a function of pH. The values obtained were compared with literature values of acid and basic ionization constants which had been determined by potentiometric titration or other methods. A significant agreement between the methods

was observed for the three compounds. All values were between 3.5 and 4.6, and the authors concluded that sulfonamides function as weak acids rather than as amphoteric compounds at physiological pH.

2.3 CZE

The first CZE method for SFAs analysis was published in 1992, when Ng *et al.* [32] made use of an overlapping resolution mapping (ORM) scheme to optimize the separation of eight SFAs in standard solutions. Initial tests using CZE conditions were unsuccessful at the pH range of 6–8. A possible explanation is that it is an intermediate zone between the two pK_a s of SFAs, which showed high variation among sulfa compounds and, in this pH range, changes in pH as small as 0.05 U could affect the resolution.

The authors chose β -CD as a modifier, which presents neutral charge in pH 6–8 and polar hydroxyl groups. For optimization, they used an ORM scheme, and chose pH and β -CD as variables. In this approach, they needed to perform nine experiments, with only one replicate at the central point conditions. If they had used a factorial design for 2² variables, they would have needed only four experiments and two or three replicates at the central point to obtain the same optimization profile. Optimum conditions obtained were 50 mM phosphate, 50 mM borate and 10 mM β -CD at pH 7.0 as BGE composition.

In a subsequent work, Ng *et al.* [33] used the optimized conditions for the separation of seven SFAs from pharmaceuticals tablets. Again, the effects of pH and β -CD were discussed. An increase in β -CD concentration decreased the migration time of analytes. The authors proposed that the benzene ring structure in the aniline moiety of SFAs and the heterocyclic ring in the radicals could be incorporated into the cavity of β -CD.

In neutral pH, some of the SFAs would be partially or totally deprotonated, depending on their pK_a values. The partially deprotonated analytes (sulfamethazine (SMZ) and SMR, $pK_a \geq 7$) elute earlier than analytes that were totally ionized ($pK_a < 7$). The authors concluded that the migration order of SFAs is pK_a -dependent; SFAs with $pK_a > \text{pH}$ of BGE, migrate faster than SFAs with pK_a below the pH of buffer.

In the study reported by Ackermans *et al.* [34] in 1992, a method using CZE was developed for the determination of sixteen SFAs in pork meat extracts. Treatment of samples was performed with an initial homogenization of 10 g of tissue with 100 mL of ACN in a stomacher, followed by centrifugation and filtration of supernatant. Filtrate was used for direct injection in the CE system.

In order to optimize the method, several conditions were examined for the determinations of effective mobilities of SFAs. They explored a high range of options of BGEs, pH, applied voltage, and injection times, utilizing

two different capillaries. The pH range tested was established between 3.2 and 8.2, with several buffers: Tris-acetate 20 mM, imidazole-acetate 10 mM, phosphate 20 mM–borate 20 mM, Tris-MES 10 mM, Tris-acetate 10 mM, and Tris-formate 10 mM.

The major differences between the effective mobilities were optimum at pH 7. Only two pairs of SFAs cannot be separated: SFA and SGD, which are both uncharged at neutral pH and migrate together with the EOF peak marker, and STZ and SMP, which have very close mobilities values. Borate 20 mM–phosphate 20 mM was chosen for quantitative analysis for the twelve SFAs which can be separated by this method.

They also calculated the pK_a values for fourteen SFAs (except SFA and SGD), based on mobilities obtained from the first experiment, which showed good agreement with literature values.

The authors also examined the matrix effects of pork meat by comparing the mobilities in separate solutions to a mixture of standards and to a “tissue standard”, *i.e.*, a matrix blank extract spiked with the pool of standards after all extraction procedures. The mobilities did not suffer significant alterations among the three analyses. The LODs obtained (2–9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were above the legal requirements, emphasizing that extraction method had no concentration step or on-capillary concentration procedure.

In a paper by Ricci and Cross [35], a method for twenty-two sulfonamides and three dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitors was described. Using a BGE with pH 7.5, 18 drugs were resolved in 22 min. In more alkaline conditions, DHFR are not resolved. Around pH 7, where the degree of ionization of SFA is highly variable, pK_a and migration time are strongly correlated. The authors found that resolution was improved by increasing phosphate buffer concentration from 25 to 100 mM, but analysis time was increased. The authors proposed that the correlation between analyte mobility and the ratio of net charge to molecular weight observed in their experiments indicate that this ratio may be used as a quick guide to the possibility of the separation of related compounds. The authors also performed a comparison between LC and CZE. This paper may be considered the first of a long series of studies on the behavior of SFAs in high concentration buffers, developed in the mid 1990s by Cross and Cao. That series was issued together with a series of studies developed with the same focus, elaborated by Lin *et al.* In the following section of this review, both series will be discussed in detail.

In 1994, Yao and Li [36] reported a three-peak variance method for the determination of diffusion coefficients of a group of SFAs by CZE. A comparison among graphical, stopped migration and low field methods was conducted, and they proposed the latter method as a simple and fast tool for the determination of diffusion coefficients.

In 1996, Wright and Dorsey [37] utilized metal ions for selective separations in CE. They added Ag (I) to the BGE in CZE and MEKC with SDS as micelle formation element, with the purpose of optimizing separation of analytes that selectively complex with silver.

Baseline resolution was obtained for the CZE separation of nine SFAs with the addition of silver nitrate 80 mM to the BGE. In MEKC experiments, separations of SFAs, which were unsuccessful in normal conditions, was achieved with the addition of 25 mM Ag (I).

Utilizing hydrodynamic injections and UV detection (254 nm) sulfadimethoxine (SDMX), SGD, SMR, SQX, SDZ, STZ, SFA, sulfacetamide, and sulfabenzamide were separated in optimized conditions, on a fused-silica capillary (50 μm id, 47 cm total length, and 40 cm effective length) under constant voltage of 20 kV, with a BGE composed by ammonium acetate pH 4 with 15% of ACN as an organic modifier and 80 mM silver nitrate.

In MEKC conditions, SFA, SGD, SPY, SMR and sulfacetamide were resolved with silver nitrate 25 mM added to the BGE HEPES pH 7 with 25 mM SDS without organic modifiers, in the same capillary and voltage applied to the CZE method.

No optimization approach was used and the method was not tested for real samples application, and the injected amounts of the standards were not specified by the authors. The advantage presented in this work lies in the introduction of another discriminatory tool to perform the separation of the most polar SFAs, like sulfaguanidine, sulfacetamide, and sulfanilamide, which show a reasonable level of difficulty for the analysis by CE conventional methods.

Veraart *et al.* [38, 39] developed an automated dialysis SPE sample preparation procedure which was coupled online to CE. They analyzed real samples (serum and urine) to determine sulfonamides (SDZ, SMR, SMA, SMP and sulfamethizole). Dialysis was shown to be a very efficient method to conduct an automated cleanup and a concentration procedure, especially to remove proteins and particulate matter from a matrix. A subsequent micro-SPE cartridge was used to concentrate analytes and remove other interferences. After that, samples were automatically injected in the CE system. LODs of 50–100 and 50–300 ng/mL were obtained in urine and serum, respectively.

In 1999, Wang *et al.* [40] reported a CZE method with amperometric detection for SFAs analysis using pharmaceutical tablets as matrices. They applied the procedure to real samples of tablets containing SDZ, SMZ, and TMP. Samples were injected electrokinetically by applying 28 kV for 10 s (see Table 1 for details). Detection was performed with a carbon-disc electrode which was made using pencil lead that was preferred after comparison with a carbon-paste electrode. The electrochemical detection system was composed of a platinum auxiliary elec-

Table 1. Representative summary of methods for sulfonamides analysis by CE

| Sulfonamides | Sample | Electrophoretic method | Detection conditions | Sample pretreatment | Detection/LOD achieved | Recovery | Ref. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------|------|
| Sulfanilamide Sulfathiazole Sulfamethoxazole Sulfaguandinine Sulfadiazine | Milk | MEKC; hydrodynamic injection (40 mbar for 12 s), fused-silica capillary (75 μm \times 53.2 cm), buffer composition: SDS 40 mM, phosphate 20 mM, pH 7.5, applied voltage 21 kV | Xenon-induced fluorescence | Extraction with hydrochloric acid, dilution with methanol, derivatization of the supernatant with fluorescamine | 1.59–7.68 Nm/L | 85–114% | [50] |
| Sulfamethoxazole SMZ Sulfamerazine Sulfadoxine Sulfatroxazole | Pork meat | CZE; pressure injection (1.8 nL), fused-silica capillary (50 mm \times 116.45 cm), experimental temperature 25°C, buffer composition: phosphate 20 mM, borate 20 mM, pH 7.0, applied voltage 30 kV | UV detection (254 nm) | Extraction with ACN and centrifugation | 2.0–9.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 100% | [34] |
| Sulfadiazine SMZ Sulfamerazine Sulfamethoxy-pyridazine Sulfasalazine Sulfaquinoxaline Sulfachlorpyridazine | Pharmaceuticals (tablets) | CZE; siphoning injection (9 cm of height by 4 s, estimated volume 1 nL), fused-silica capillary (50 μm \times 50 cm), buffer composition: phosphate 50 mM, borate 50 mM, β -CD 10 mM, pH 7.0, applied voltage 15 kV | UV detection (210 nm) | Dissolution and dilution with NaOH 25 mM | Not available | 86% | [33] |
| Sulfadiazine SMZ Sulfamerazine Sulfachlorpyridazine Sulfapyridine Sulfamether SDMX Sulfamethoxazole Sulfamethizole | Ground water Meat | CZE, fused-silica capillary (75 μm \times 64.5 cm), experimental temperature 27°C, buffer composition: phosphate 45 mM, 10% methanol, pH 7.3, applied voltage 25 kV | UV detection | Solvent extraction, SPE cleanup and a LVSS with polarity switching | 2.59–22.95 $\mu\text{g}/\text{L}$ | Not available | [43] |
| Sulfadiazine SMZ | Tablets | CZE, electrokinetic injection (28 kV for 10 s), polyimide-coated fused-silica capillary (25 μm \times 75 cm), buffer composition: phosphate 20 mM, pH 6.2, applied voltage 30 kV | Amperometric detection | Dissolution and dilution with phosphate buffer 20 mM pH 6.2 | 1.0 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 97% 103% | [40] |
| Sulfadiazine SMZ Sulfamerazine Sulfamedimethoxine Sulfamonomethoxine Sulfaphenazole Sulfaquinoxaline Sulfisoxazole | Meat | CZE, pressure-injected mode (50 mbar for 15 s), fused-silica capillary (50 μm \times 80.5 cm), experimental temperature 25°C, buffer composition: phosphate 35 mM, pH 6.5, applied voltage 25 kV | UV detection (205 nm) | Extraction with ACN, cleanup procedures with two SPE cartridges (Sep-Pak Alumina N and Oasis HLB), evaporation and reconstitution with water/ACN (50:50) | 5–10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 81–97% | [42] |

Table 1. Continued

| Sulfonamides | Sample | Electrophoretic method | Detection conditions | Sample pretreatment | Detection/LOD achieved | Recovery | Ref. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------|------|
| Sulfadiazine Sulfamethoxazole TMP | Tablets | Flow-injection CE (FI-CE) in a "lab-on-a-chip" device. A H-channel microchip was integrated with a fused-silica capillary (75 $\mu\text{m} \times 65 \text{ cm}$; 35 cm effective length), BGE composition: phosphate 30 mM pH 6.0, applied voltage 1.0 kV | UV detection (214 nm) | Tablets are powdered and extracted with ethanol/water (1:1), diluted and filtered before injection | 1.05–1.28 g/mL | 97–107% | [57] |
| Sulfamethoxy-pyridazine Sulfachlorpyridazine Sulfasalazine Sulfamerazine Sulfaguanidine Sulfadiazine SMZ Sulfathiazole Sulfanilamide Sulfapyridine Sulfisoxazole Sulfabenzamide | Pork meat | CZE, pressure injection: 1 psi for 10 s. Fused-silica capillary (75 $\mu\text{m} \times 75 \text{ cm}$), BGE composition: ammonium acetate 50 mM pH 4.16, applied voltage 23 kV, controlled temperature at 20°C. Electrospray in positive mode for MS analysis; sheath liquid methanol/water/formic acid (49.5:49.5:1.0) | MS/MS detection | Samples are homogenized with diatomaceous earth and applied to pressurized PLE. Extraction cycles were made with hot water at 160°C. Combined extracts were eluting in an Oasis HLB SPE cartridge. Final eluate was evaporated and reconstituted with running buffer. | 1.56–12.5 ng/g | 76–100% | [55] |
| Sulfamethoxazole Sulfachlorpyridazine Sulfaisomidine Sulfamerazine Sulfaguanidine SMZ Sulfathiazole Sulfanilamide Sulfapyridine Sulfaphenazole | Standard solutions | CZE, electrodynamic injection: 5 kV for 5 s. Fused-silica capillary (75 $\mu\text{m} \times 35.5 \text{ cm}$; 28.5 cm effective length) with a C18 plug (3 μm ODS-1 Spherisorb). BGE composition: ACN/citrate buffer 10 mM (40:60) in several pH conditions, applied voltage 20 kV | UV detection (254 nm) | Not applied | Amounts of injected solutions are not reported | Not applied | [56] |
| Sulfamerazine SMZ Sulfathiazole Sulfamethizole Sulfadiazine SDMX | Milk | CZE, pressure injection: 50 mbar for 10 s. Fused-silica capillary (75 $\mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$). BGE composition: ammonium acetate 50 mM pH 8.5, applied voltage 20 kV, temperature controlled at 20°C. CE-MS interface sheath liquid: methanol/water (50:50) with 1.5% formic acid at a 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ or 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ | MS/MS or MS detection | CFS controlled by a six-way injection valve, methanol is applied to milk samples to precipitate proteins. Supernatant is introduced online to CE-MS system. For confirmatory analysis, milk is precipitated before introduction in CFS. Inside the device, serum is purified with C18 and introduced online to be analyzed. | 0.6–1.0 ng/mL | 89–96% | [54] |

Table 1. Continued

| Sulfonamides | Sample | Electrophoretic method | Detection conditions | Sample pretreatment | Detection/LOD achieved | Recovery | Ref. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|------|
| Sulfanilic acid Sulfamethoxy- pyridazine Sulfamerazine Sulfaguandinine Sulfadiazine SMZ Sulfathiazole Sulfanilamide Sulfapyridine Sulfisoxazole Sulfacetamide Sulfamether Sulfamethoxazole SDMX Sulfaquinoxaline Succinyl-STZ Phthalyl-STZ | Standard solutions | MEKC, hydrodynamic injection: 50 mbar for 3.6 s. Fused-silica capillary (50 μm \times 60 cm, 40 cm of effective length). BGE composition: phosphate–borate 25, 100 mM SDS, pH 8.5, applied voltage 22 kV, temperature controlled at 20°C | UV detection (205 nm) | Standard solutions of a mix of SFAs, TMP, pyrimethamine and β -lactams were injected. No amounts are described. Confirmation of peaks identity were obtained by characteristic DAD spectra. | Amounts of injected solutions are not reported | – | [48] |

trode, a working electrode and an Ag/AgCl (KCl 3 M) reference electrode. The voltage applied to the working electrode was optimized to +1275 mV.

Experiments conducted in the pH range of 4–8 demonstrate that separations were more effective at pH 6.2 in a 20 mM phosphate buffer concentration. A relatively high voltage (28 kV) was chosen because it affords a short run time. At this voltage, the EOF was increased, and in low voltages, a broadening of peaks was observed. LODs obtained were 1.0 $\mu\text{M/L}$ for SDZ and SMZ. Recoveries were 97 and 103% to SDZ and SMZ, respectively.

In 2000, Luo *et al.* [41] published a CZE method for the determination of SMA and TMP in sulfatrim tablets. They used a 27 cm long fused-silica capillary (20 cm effective length) with 50 μm id and CZE was performed in 50 mM ammonium acetate buffer solution pH 5.5 under the applied voltage of 25 kV. The two active ingredients were completely separated within 1.5 min, and quantified with a UV detector at 214 nm by external standard calibration. RSDs of 1.0% for SMA and 0.8% for TMP were achieved for ten determinations of a sample solution containing 141.7 mg/L SMA and 25.6 mg/L TMP. Recoveries of 98 and 101% were obtained, respectively for spiked SMA and TMP. LODs, obtained by calculation method (3σ) were 3.5 mg/L for SMA and 1.1 mg/L for TMP.

In 2003, Fuh and Chu [42] reported a method to determine SMZ, SMR, SDZ, SDMX, SQX, sulfamonomethoxine, sulfaphenazole, and sulfisoxazole in pork, chicken, and beef samples. The sample extraction procedures consisted of extraction of the homogenized tissues with ACN. Two different SPE cartridges were used to remove the co-extracted endogenous compounds. The first one, Alumina N, to remove polar interferences, was followed by an Oasis HLB adsorbent cartridge. Final elution with

methanol was carried out, which was evaporated to dryness and reconstituted with ACN/water (50:50) containing 3 $\mu\text{g/mL}$ 1-naphthoxyacetic acid as internal standard.

Despite the fact that the study of recoveries and repeatability ranged in zones below and above the MRLs, the LOD obtained *via* calculation was below the MRL established by the European Community (100 $\mu\text{g/kg}$). Recoveries ranged from 80 to 97%, and complete separation of eight SFAs was achieved in 17 min.

A method reported by Soto-Chinchilla *et al.* [43] in 2006 proposed the same extraction procedure developed by Fu and Chu [42] to analyze meat and ground water samples. Using Alumina B and Oasis HLB as associated SPE cleanup and concentration process, the final eluate was evaporated to dryness and reconstituted with 750 μL imidazole 10 mM with 10% methanol containing *p*-aminobenzoic acid (PABA) as internal standard. For samples of underground water, only an Oasis HLB SPE cartridge was used in order to cleanup and concentrate the analytes.

The advantage of this work was that it presented, for the first time, a strategy for offline (by SPE) and online concentration of the analytes, using, for this latter purpose, a large-volume sample stacking (LVSS) procedure. They analyzed nine SFAs (SDZ, SDMX, SPY, SMA, SMZ, SMT, SMR, sulfamether, and SMP) using a diode array detector (DAD) and a fused-silica capillary with a bubble cell with an optical path length of 200 μm . The BGE was an aqueous solution of sodium dihydrogen phosphate/dipotassium hydrogen phosphate 45 mM pH 7.3 containing 10% methanol. The wavelength used was 265 nm and the applied voltage was 25 kV.

The LVSS procedure was based on filling the whole capillary with the sample and, by switching the voltage, concentrate the analytes by band compression. In the

method discussed, a negative voltage of -28 kV was applied after injection. By monitoring the electric current, which increased to normal value as the low-conductivity injected zone was eliminated from the capillary, they were able to monitor the matrix removal. At this point, the stacking was complete and the voltage was then switched to positive (25 kV) to perform the electrophoretic separation of SFAs.

The method was validated with the determination of the range of work, linearity, LOD (2.59 – 22.95 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and LOQ. Recovery studies were performed, which varied from 81 to 99% . The combined use of offline and online concentration strategies provided limits that were low enough to satisfy the legal requirements. Nevertheless, the LVSS procedure cannot be completely automated in the current CE commercial systems and this fact is an important factor for routine analysis.

In a following paper, the same authors report analysis of the same nine SFAs plus sulfadoxine and TMP residues also in meat and ground water, but applying MS detection [44].

Experimental design and effective mobility calculations are used by Mamani *et al.* [45] to develop a multi-class method for quality control. Real samples of pharmaceutical formulations containing SMZ (tablets and an oral suspension) were analyzed using CZE. Separations were achieved using 60 mM/L sodium phosphate plus 20 mM/L sodium tetraborate and DAD detector.

For improvement of detection, field-amplified sample stacking associated with polymer monolith microextraction was applied by Li *et al.* [46] to the determination of twelve SFAs residues in chicken meat. SFAs were extracted from chicken meat with ACN and the obtained extract was applied to a solid-phase microextraction procedure, using poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) as sorbent. Separation and detection were achieved with 100 mM/L sodium phosphate pH 7.3 as BGE and UV detection (270 nm). LOD values from 3.49 to 16.7 ng/g and LOQ values from 11.6 to 55.5 ng/g were obtained. At the MRL spike level (100 ng/g), recoveries from 96.4 to 104% were achieved. They also used pseudoephedrine as internal standard.

2.4 MEKC

Hows *et al.* [47] reported the development and optimization of a MEKC method for SFAs, β -lactams antibiotics, and DHFR inhibitors (TMP and pyrimethamine). Sulfanilic acid, sulfacetamide, sulfamether, sulfisoxazole, SFA, SGD, SMR, SMZ, SMP, SMA, SDZ, STZ, SPY, SDMX, and SQX were separated with relative resolution. Also, two prodrugs of STZ were included, succinyl-STZ and phthalyl-STZ.

The authors used the method proposed by Dang *et al.* [48] as initial condition. From this point on, they

designed a Box-Behnken model, and defined the number of peaks as the response factor and pH, voltage, and SDS concentration as the independent variables. Correlation between observed peaks versus predicted peaks was tested to validate the model. Surface response plots indicated the optimum zones for each interacting factor (first order interactions). The predicted optimum points (pH 8.5 , 100 mM SDS, 22 kV) were tested with standard solutions. To produce comparison, a traditional optimization process based on the univariate method was carried out in parallel, using the same three factors (pH, voltage and SDS amount). Obviously, this last method required an expressively higher number of experiments (60 vs. 15 in a factorial design approach) to achieve a satisfactory model. The traditional method provides pH 8.5 , a voltage of 15 kV and 100 mM SDS.

In both methods, some analytes were not very well separated, with poor resolution to few pairs and a relatively longer run time (more than 25 min). One can assume that, using another factor of response, perhaps resolution, or a combination of resolution and time of migration, then more adequate response surfaces would have been produced. Also, the response surface indicates that an improvement in response may be achieved in the neutral pH range. This conclusion can be obtained with the observation that the pH surfaces do not show a peak shape, rather, the form is that of an ascending ramp.

Another method using MEKC analysis was published in 1998 [49]. The authors aimed to obtain $\log P$ values for a very large series of drugs, including SFAs. The $\log P$ as defined by a physicochemical parameter is normally measured as the ratio of the concentration of a drug between the two phases, 1-octanol and water, and is defined by the logarithm of the thermodynamic partition coefficient, $\log P$, a very important parameter of hydrophobicity, which is enormously relevant in drug design. The study showed a comparison between $\log P$ values obtained by MEKC and RP-HPLC, with the purpose of obtaining these data more quickly and at lower costs as compared to the traditional “shake-flasking method”. The experimental data was plotted against $\log P$ values obtained by the classic method. The authors proposed an equation that included and normalized $\log P$ data obtained by both methods, MEKC and RP-HPLC, and the values provided by equation showed a better correlation with literature data than HPLC or MEKC values separately.

The only sulfa drug investigated in a series composed of 106 drugs examined, including acidic, neutral, and basic drugs, was SMA.

Concerning MEKC in particular, the best results were obtained with the use of bile salts (taurodesoxycholic acid sodium salt) with the addition of phosphatidylcholine to simulate the biological membrane binders. They used a 57 cm long fused-silica capillary (50 cm effective length),

50 μm id, and UV detection at 214 nm. Injections were made with 20 psi (1 s high pressure). BGE was taurodesoxycholate 40 mM – phosphatidylcholine 25 mM in borate buffer 50 mM pH 8. The test solutions had concentrations of 0.5–1.0 mg/mL dissolved with taurodesoxycholate 40 mM – borate 50 mM pH 8.

For SMA, the $\log P$ value obtained by MEKC was 0.20, by RP-HPLC was -0.97 , and by the classic method described in the literature it was 0.89.

Residues of sulfonamides in milk were also determined by Lamba *et al.* [50] using MEKC coupled with fluorescence detection. Five sulfonamides were separated within 7 min with an LOD of 1.59–7.68 nM/L, with recovery values from 85 to 114%. Sample treatment included extraction with hydrochloric acid, dilution with methanol, and derivatization with fluorescamine.

2.5 CE with mass detection – CE-MSn

The first work of sulfonamides analysis by CE was reported in 1991 [51], utilizing a hyphenated method with CE coupled to a triple quadrupole mass spectrometer with an ESI system (CE-MS/MS). Separations of sulfonamides and benzodiazepines were performed in an uncoated fused-silica capillary. The capillary column exit was connected to a liquid junction-ion spray interface combination to the MS system. Online UV detection occurred 20 cm away from the capillary inlet and with the mass spectrometer after the entire capillary length (100 cm). The separations were made using volatile buffers composed of ammonium acetate (15–20 mM) with 15–20% methanol. The only sulfa drug analyzed was SMZ and the lowest amount of SMZ applied with structural information characteristic of the sulfa drug obtained was 2 pmol in on-column injection.

Pleasance *et al.* [52] also made use of a CE-MS method to analyze SMZ and sulfaisodimidine, two isomers, in confirmatory mode, monitoring two daughter ions. The first of them, m/z 279 > 156, is common for both drugs but the confirmatory transition for SMZ is m/z 279 > 213, which corresponds to the loss of H_2 and SO_2 , exclusively produced by SMZ. Analysis of SMZ was performed only with standard solutions. The authors also reported the determination of SDMX residues in shellfish (oyster) extract spiked with 1 $\mu\text{g/g}$ of the sulfa target, which was monitored by transition of m/z 311 > 156. This work included a detailed description of the design of two interchangeable interfaces for CE-MS utilizing ionspray, and a comparison among various injection modes employed in commercial CE systems was performed. The ionspray probe in a liquid-junction interface was compared with a coaxial interface, which was shown to be capable to provide more reproducible results.

Another hyphenated method based on CE-MS/MS was reported by Bateman *et al.* [53] for the multi-residue anal-

ysis of sulfonamides in milk samples. In this work, for the first time, the detection of SFAs at ppt level was achieved using CE methods. Three pairs of isomeric sulfonamides that differ only in the positions of the nitrogen and oxygen atoms in the heterocyclic aromatic rings of the molecules were analyzed and distinguished through a quasi-MS/MS/MS method with nano-ESI. In-source CID was used as a quasi-MS/MS stage to generate ions arising from the heteroaromatic amine moiety. In a second MS/MS step these ions were isolated and made to undergo CID in the collision quadrupole to yield isomer-specific ions. The authors also performed analysis with real milk samples.

Santos *et al.* [54] reported in 2005 a CE-MS method for the screening and confirmation of SFAs in milk. They developed a screening unit that provided a continuous flow system (CFS) to precipitate milk proteins and, sequentially, inject the samples in CE-MS equipment through an online connection.

Screening MS method monitored the common ion with m/z ratio of 156 generated by all SFAs. Analytes were ionized using an electrospray interface in positive mode followed by tuning and fragmentation of the selected m/z ratios. In the confirmatory mode, fragmentation of the precursor ions was not realized and the SFAs were identified based on the characteristic m/z ratio of precursor ions $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Six SFAs were applied to the method (SMZ, SDZ, STZ, SDMX, SMR, and sulfamethizole). The sample pretreatment device was based on a six-way injection valve used to allow the continuous injection of milk samples and delivery of methanol which reacted with milk in a reaction coil to precipitate proteins that were retained in a column filled with cotton and nylon filter. The serum was introduced in a vial and conducted to CE-MS system to analysis.

For confirmatory analysis, milk samples were precipitated before the introduction in the CFS device. Inside the device, the serum was applied to a C18 filled column. Analytes were eluted with methanol, which was directly introduced in an empty vial to be analyzed sequentially.

Several parameters were optimized, varying only one parameter at each experiment (univariate method). BGE composition, pH and concentration were examined according to this procedure, as well as capillary temperature, applied voltage, composition of the sheath liquid, and other parameters. The authors found adequate conditions that are described in Table 1. Briefly, the electrophoretic separation was performed in CZE mode with ammonium acetate 50 mM pH 8.5 as BGE, which provided a negative charge to SFAs.

The LODs obtained varied from 0.6 to 1.1 ng/mL and LOQ varied from 2.0 to 6.0 ng/mL. Recoveries varied from 89 to 96%. Despite the difficulty to replicate the CFS system in routine laboratories, which are not yet commer-

cially available, this work presented an instrument that can be used as screening and confirmatory method by merely changing instrumental parameters, *via* software. Blank samples could have been analyzed between spiked samples to verify the possibilities of crosscontamination of the CFS device, whereas the quasi-ppt levels of detection were determined by Santos *et al.*

Font *et al.* [55] reported a CE-MS/MS method for the determination of twelve SFAs in pork meat. They applied a pressurized liquid extraction (PLE) associated with an SPE step for concentration and cleanup of analytes. This strategy, associated with the high sensibility provided by MS detection achieved LOD and LOQ below 12.5 and 46.5 ng/g, respectively. Also, for the first time, a CE method for sulfa analysis in food was validated considering parameters proposed by the 2002/657/EC European Decision.

STZ, SDZ, SMP, SGC, SFA, SDMX, SPY, SCP, SMZ, sulfisoxazole, sulfasalazine, and sulfabenzamide were the SFAs included in this work.

PLE is a relatively recent tool in separation sciences and usually provides rapid and reliable analysis using low-toxicity solvents. In the method developed by Font *et al.*, hot water was used in the PLR process in a commercial PLE system in which 10 g of homogenized tissue blended with 10 g of diatomaceous earth was packed in a PLE cell extraction. The SFAs were extracted at 160°C, generating *ca.* 40 mL of aqueous extract at each PLE cycle. The extracts were concentrated using an Oasis HLB SPE cartridge and finally eluted with methanol (2 mL) which was evaporated to dryness. The residue was reconstituted with 1 mL of running buffer. A ten-fold concentration factor was obtained with PLE-SPE procedures.

The CE-MS interface was constructed utilizing a commercial device designed for this purpose. The sheath liquid used for the ionization of analytes plug at the end of capillary was a mixture of methanol/water/formic acid (49.5:49.5:1.0) to provide an ESI in positive mode.

One of the great merits of this study was the application of the method to a high number of real samples ($n = 50$), including natural contaminated samples, obtained from animals treated with feed that contained 300 mg% SMZ for five consecutive days.

Validation was performed in accordance to the 2002/657/EC guidelines. The researchers worked with spiked samples in six different levels to determine several parameters as LOD, LOQ, linearity, accuracy, interday variation (RSD), decision limit ($CC\alpha$), and detection capability ($CC\beta$), which were determined using the calibration curve procedure, described in the European Decision. $CC\alpha$ values varied from 102 to 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and $CC\beta$ from 104 to 109 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Influence of BGE composition, concentration, and pH were examined according to a univariate strategy. Identification points for confirmatory analysis of SFAs identity

by MS/MS monitoring varied from 4 to 11.5 points. A minimum of 4 points is required for compliance with 2002/657/EC.

2.6 Miscellaneous

Dube and Smith [56] presented a CEC method for SFAs separation. The overall aim of the researchers was to evaluate the performance of CEC to separate amphoteric compounds in acidic, basic, and neutral conditions. CEC makes use of advantages of CE and HPLC, *i.e.*, it provides a separation with the plug-like flow of CE associated with the discriminatory properties of stationary phases of HPLC. Nevertheless, CEC has limitations, especially concerning ionization variation in analytes.

Experiments were carried out in three different conditions: low, neutral, and high pH. All runs use the same BGE, a mixture of ACN and citrate buffer 10 mM (40:60) with the pH adjusted to desired values. A plug of C18 stationary phase filled the capillary.

In acidic conditions, a low EOF was observed and the majority of SFAs existed as positively charged species and thus behaved like weak bases. Depending on the pH, the authors observed the predominance of electrophoretic or chromatographic behavior that dictated the patterns of elution/migration. In high pH (6.9), despite the EOF increment, several SFAs were negatively charged and migrated to the injection point. At this pH the run time was very long (more than 80 min), and electrodynamic injection was not possible because some anionic SFAs remained in the input flask of the CEC system.

Fan *et al.* [57] proposed a simple and very fast method for flow injection CE in a lab-on-a-chip device developed in their laboratory. The samples are continuously applied in a channel linked with a fused-silica capillary, and detection was performed in UV 214 nm. This method was applied for real samples, in this case, pharmaceutical tablets containing TMP, SDZ and/or SMA. The authors investigated several factors of the influence of the method, like pH, buffer concentration, voltage, and carrier flow rate through a univariate analysis. The performance was evaluated on a repeatability basis with an RDS of 2.23% (TMP), 1.19% (SDZ), and 2.64% (SMA). LODs ($S/N = 3$) were 0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (TMP), 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SDZ), and 1.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SMA). The recovery values for SMA was 97–100% and 107% for SDZ.

3 Electrophoretic behavior of sulfonamides

In the 1990s, two parallel series of papers were published, both using sulfonamides as models to perform the experimental sets of data to add to the theoretical discussion about electrophoretic behavior [58–66]. SFAs are

quite useful for that end, not only due to their amphoteric behavior, which provides CE analysis of these compounds in negative, neutral or positive forms, but also because of their easy manipulation, low cost, as well as for being relatively toxic-free.

A comprehensive discussion of all aspects of these very important contributions is not the purpose of this review. Briefly, works of Cross, Cao, Lin, and other researchers demonstrate that sulfonamides electrophoretic behavior is more correctly predicted if “charge-to-mass” ratios of these compounds are used in place of the effective charge (z) to correlate with electrophoretic mobility. Data provided by these references should be considered in future studies of sulfonamide behavior in electrophoresis.

Jouyban and Yousefi [67] investigated a quantitative structure property relationship to predict the electrophoretic mobilities of sulfa drugs. They proposed a model which employed the logarithm of electrophoretic mobility ($\ln \mu_{ep}$) as dependent variable and partial charge, total energy, heat of formation, and molecular refractivity as independent variables. The applicability of the model was examined in real mobility data of five experimental datasets, one of them with thirteen SFAs. The electrophoretic mobilities values had been borrowed from the work of Lin *et al.* [58]. The correlative analysis showed that the model proposed by the authors was able to predict electrophoretic mobilities. A plot of predicted data *versus* experimental mobilities obtained by Lin and coworkers showed a significant correlation ($R = 0.932$).

The experimental data obtained by Lin *et al.* [58, 60] was also the object of a comparative study between multiple linear regression, and artificial neural networks have been carried out employing electrophoretic mobility of sulfonamides [68]. The authors used heat of formation, positive partial charge, and surface area of SFAs in their anionic form as independent variables and a 3-4-2 artificial neural network in which the mentioned descriptors (independent variables) are the input values, while effective electrophoretic mobility was the output. Based on the correlation coefficients and the standard errors range, they concluded that the artificial neural network shows better accuracy over the multiple linear regression model to predict SFAs electrophoretic mobilities.

Schott and Astigarrabia [31] determined the pIs of SFA, SPY, SDZ, and sulfafurazole microelectrophoresis of diluted suspensions as a function of pH. pIs were calculated from values of acid and basic ionization constants obtained from the literature (determined by potentiometric titration). The authors also made the use of ultraviolet absorption spectra data and solubility parameters. Satisfactory correlation was observed between the two methods of determination. Values were between 3.5 and 4.6, indicating that sulfonamides function as weak acids rather than amphoteric compounds at physiological pH.

Geiser *et al.* [69] have made the use of the CZE method to measure the acidic dissociation constant (pK_a) of SDMX, SFA, sulfafurazole, sulfabenzamide, and sulfadoxine as well as of many other drugs. They used a dynamic coating procedure in the capillary to obtain an increase in EOF and thus reduce the analysis time, using Ceofix™ buffer pH 2.5 (polycation – polyanion sequential treatment) to provide a constant number of negative charges in internal wall of capillary.

Kaliszan *et al.* [70] used the well-known quantitative structure – retention relationships of metal cations in CE to propose similar descriptors to relatively large organic compounds such as sulfonamides. Based on ionic radius, atomic mass, and ionization energy as structural parameters, they made the comparison between predicted values of electrophoretic retardation factor and concluded that the molecular mass can be considered a first approximation to predictable electrophoretic parameters. No consideration about Cross and Li discussions were made in this work.

4 Conclusions

CE is a versatile and adequate tool for sulfonamide analysis in pharmaceuticals, food, and environmental samples. Improvements in concentrations and LODs are required in order to comply with legal requirements and international proposed criteria. Hyphenated methods such as CE-MS or CE-MS/MSn present the sensitivity and specificity of mass detection coupled to high resolution and low-solvent consumption of CE. Probably, with the automation of extraction and clean-up steps and the expansion of commercially available systems for CE-MS, these kinds of methods will play a more important role in the near future.

The authors declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Connor, E. E., *Prim. Care Update Ob Gyns* 1998, 5, 32–35.
- [2] Mitsuhashi, S., *J. Int. Med. Res.* 1993, 21, 1–14.
- [3] Miert, A. S. J. P. A. M. V., *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1994, 17, 309–316.
- [4] Dogmak, G., *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1922–1941*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1965.
- [5] Lofflin, J., *Vet. Med.* 2005, 100, 12–19.
- [6] Cribb, A. E., Lee, B. L., Trepanier, L. A., Spielberg, S. P., *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 1996, 15, 9–50.
- [7] Scozzafava, A., Owa, T., Mastrolorenzo, A., Supuran, C. T., *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 925–953.
- [8] Patel, O. G., Mberu, E. K., Nzila, A. M., Macreadie, I. G., *Trends Parasitol.* 2004, 20, 1–3.
- [9] Chattopadhyay, R., Mahajan, B., Kumar, S., *Expert Opin. Drug Saf.* 2007, 6, 505–521.
- [10] Wassenaar, T. M., *Crit. Rev. Microbiol.* 2005, 31, 155–169.
- [11] Acar, J. F., Moulin, G., *Rev. Sci. Tech. OIE* 2006, 25, 775–792.

- [12] Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Halling-Sorensen, B., Tolls, J., *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 286A–294A.
- [13] D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., Wright, G. D., *Science* 2006, 311, 374–377.
- [14] Wright, G. D., *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5, 175–186.
- [15] Mollenhauer, H. P., *Residue Rev.* 1967, 19, 1–10.
- [16] Struciński, P., Góralczyk, K., Czaja, K., Hernik, A., Korcz, W., Ludwicki, J. K., *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 2007, 58, 377–388.
- [17] Furusawa, N., Mukai, T., *J. Chromatogr. A* 1994, 677, 81–85.
- [18] Ricci, M. C., Cross, R. F., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1996, 19, 3155–3171.
- [19] Kishida, K., Furusawa, N., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2003, 26, 2931–2939.
- [20] Furusawa, N., *J. Chromatogr. Sci.* 2003, 41, 377–380.
- [21] Furusawa, N., *Anal. Chim. Acta* 2003, 481, 255–259.
- [22] Furusawa, N., *Chromatographia* 2003, 57, 317–320.
- [23] Wang, S., Zhang, H. Y., Wang, L., Duan, Z. J., Kennedy, I., *Food Addit. Contam.* 2006, 23, 362–384.
- [24] Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 283–303.
- [25] Garcia-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2006, 27, 266–282.
- [26] Garcia-Canas, V., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 294–309.
- [27] Hernandez, M., Borruell, F., Calull, M., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 416–427.
- [28] Rashkovan, B. A., Sementovskaia, G. P., *Farm. Zh.* 1968, 23, 50–55.
- [29] Lepri, L., Desideri, P. G., Tanturli, G., *J. Chromatogr.* 1974, 93, 201–210.
- [30] Lott, A. F., Smither, R., Vaughan, D. R., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985, 68, 1018–1020.
- [31] Schott, H., Astigarrabia, E., *J. Pharm. Sci.* 1988, 77, 918–920.
- [32] Ng, C. L., Lee, H. K., Li, S. F. Y., *J. Chromatogr.* 1992, 598, 133–138.
- [33] Ng, C. L., Lee, H. K., Li, S. F. Y., *J. Chromatogr.* 1993, 632, 165–170.
- [34] Ackermans, M. T., Beckers, J. L., Everaerts, F. M., Hoogland, H., Tomassen, M. J. H., *J. Chromatogr.* 1992, 596, 101–109.
- [35] Ricci, M. C., Cross, R. F., *J. Microcolumn Sep.* 1993, 5, 207–215.
- [36] Yao, Y. J., Li, S. F. Y., *J. Chromatogr. Sci.* 1994, 32, 117–120.
- [37] Wright, P. B., Dorsey, J. G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 415–424.
- [38] Veraart, J. R., Van Hekezen, J., Groot, M. C. E., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N. H., Brinkman, U. A., *Electrophoresis* 1998, 19, 2944–2949.
- [39] Veraart, J. R., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N. H., Brinkman, U. A. T., *HRC J. High Resolut. Chromatogr.* 1999, 22, 183–187.
- [40] Wang, A., Gong, F., Li, H., Fang, Y., *Anal. Chim. Acta* 1999, 386, 265–269.
- [41] Luo, J., Chen, H., Zhang, S., *J. Anal. Sci.* 2000, 16, 123–126.
- [42] Fuh, M. R. S., Chu, S. Y., *Anal. Chim. Acta* 2003, 499, 215–221.
- [43] Soto-Chinchilla, J. J., Garcia-Campana, A. M., Gamiz-Gracia, L., Cruces-Blanco, C., *Electrophoresis* 2006, 27, 4060–4068.
- [44] Soto-Chinchilla, J. J., García-Campana, A. N., Gámiz-Gracia, L., *Electrophoresis* 2007, 28, 4162–4172.
- [45] Mamani, M. C. V., Amaya-Farfan, J., Reyes, F. G. R., Silva, J. A. F., Rath, S., *Talanta* 2008, 76, 1006–1014.
- [46] Li, T., Shi, Z.-G., Zheng, M.-M., Feng, Y.-Q., *J. Chromatogr. A* 2008, 1205, 163–170.
- [47] Hows, M. E. P., Perrett, D., Kay, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 97–104.
- [48] Dang, Q. X., Sun, Z. P., Ling, D. K., *J. Chromatogr.* 1992, 603, 259–266.
- [49] Hanna, M., de Biasi, V., Bond, B., Salter, C., Hutt, A. J., Camilleri, P., *Anal. Chem.* 1998, 70, 2092–2099.
- [50] Lamba, S., Sanghi, S. K., Asthana, A., Shelke, M., *Anal. Chim. Acta* 2005, 552, 110–115.
- [51] Johansson, I. M., Pavelka, R., Henion, J. D., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 515–528.
- [52] Pleasance, S., Thibault, P., Kelly, J., *J. Chromatogr.* 1992, 591, 325–339.
- [53] Bateman, K. P., Locke, S. J., Volmer, D. A., *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 297–304.
- [54] Santos, B., Lista, A., Simonet, B. M., Rios, A., Valcarcel, M., *Electrophoresis* 2005, 26, 1567–1575.
- [55] Font, G., Juan-Garcia, A., Pico, Y., *J. Chromatogr. A* 2007, 1159, 233–241.
- [56] Dube, S., Smith, R., *Chromatographia* 2001, 53, 51–56.
- [57] Fan, L. Y., Chen, H. L., Chen, X. G., Hu, Z. D., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1376–1382.
- [58] Lin, C. E., Lin, W. C., Chen, Y. C., Wang, S. W., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 37–47.
- [59] Lin, C. E., Lin, W. C., Chiou, W. C., Lin, E. C., Chang, C. C., *J. Chromatogr. A* 1996, 755, 261–269.
- [60] Lin, C.-E., Chang, C. C., Lin, W. C., *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 105–112.
- [61] Cross, R. F., *J. Chromatogr. A* 2001, 907, 357–360.
- [62] Cross, R. F., Cao, J., *J. Chromatogr. A* 1998, 818, 217–229.
- [63] Cross, R. F., Cao, J., *J. Chromatogr. A* 1998, 809, 159–171.
- [64] Cross, R. F., Cao, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 786, 171–180.
- [65] Cross, R. F., Cao, J., *J. Chromatogr. A* 1999, 849, 575–585.
- [66] Cross, R. F., Cao, J., *J. Chromatogr. A* 1998, 806, 365.
- [67] Jouyban, A., Yousefi, B. H., *Comput. Biol. Chem.* 2003, 27, 297–303.
- [68] Jalali-Heravi, M., Garkani-Nejad, Z., *J. Chromatogr. A* 2001, 927, 211–218.
- [69] Geiser, L., Henchoz, Y., Galland, A., Carrupt, P. A., Veuthey, J. L., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 2374–2380.
- [70] Kaliszán, R., Turowski, M., Bucinski, A., *Quant. Struct-Act. Relat.* 1995, 14, 356–361.

Capítulo III - Development and validation of screening and confirmatory methods for sulfonamides residues analysis by capillary electrophoresis and LC-MS/MS according to the European Union regulation 2002/657/EC. Este manuscrito foi submetido à publicação no suplemento especial sobre resíduos de drogas veterinárias do *Journal of Chromatography A* e apresenta os resultados obtidos no desenvolvimento e validação dos métodos de análise de triagem e de confirmação realizados, respectivamente, por eletroforese capilar e espectrometria de massas.

1 **Development and validation of screening and confirmatory methods for sulfonamides residues**
2 **analysis by capillary electrophoresis and tandem mass spectrometry according to the European**
3 **Union regulation 2002/657/EC**

4
5
6 Rodrigo Barcellos Hoff^{1,2}, Fabiano Barreto² and Tarso B. Ledur Kist³

7 ¹Programa de Pós-Graduação e Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Estado do
8 Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Ministério
9 da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS,
10 Porto Alegre, RS, Brazil. ³Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do
11 Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

12
13
14 **Correspondence:** ²Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional
15 Agropecuário – LANAGRO/RS, Estrada da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS,
16 Brazil.

17 Telephone: +55 51 3248 2133.

18 Fax: 55 51 3248 2690

19 E-mail: rodrigo.hoff@agricultura.gov.br

20
21
22 **Abstract**

23
24 A multiresidue method is described for determining six sulphonamides (SAs) (sulfadiazine,
25 sulfathiazole, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline and sulfadimethoxine) in liver by a
26 capillary electrophoresis screening method and a liquid chromatography coupled to tandem mass
27 spectrometry confirmatory assay. Samples were prepared by homogenizing the tissue, extracting the
28 liquid extract from the tissue and direct injection in the capillary electrophoresis system or mass
29 spectrometry system for confirmatory analysis. The detection of analytes was achieved by laser-
30 induced fluorescence in capillary electrophoresis. Procedures were validated according to the European
31 Union regulation 2002/657/EC determining specificity, decision limit, detection capability, trueness
32 and precision. The results of validation process demonstrate that the method is suitable for application
33 in Brazilian statutory veterinary drug residue surveillance programs.

34 **Keywords:** sulfonamides, capillary electrophoresis, tandem mass spectrometry, validation, residue
35 analysis, 2002/657/EC.

36
37
38 **1. Introduction**

39
40 Sulfonamides are the first antimicrobial group of drugs used in the therapy [1, 2]. These compounds are
41 still used today in the medicine and they are used in the veterinary medicine also for the growth
42 promoter effects [3, 4]. The possible presence of sulfonamides residues in products of animal origin is a
43 public health concern. Improved methods of sulfonamides analysis are a constant challenge for the
44 researchers. Several methods has been developed for this purpose in many kinds of analytical tools,
45 like high performance liquid chromatography, gas chromatography, thin layer chromatography, ELISA
46 and others [5-14]. In recent years, advances in sulfonamides residues analysis were published using
47 more recent technologies like capillary electrophoresis and tandem mass spectrometry [15-19].

1
2 Capillary electrophoresis (CE) is a recently analytical tool for food analysis, which can provide a
3 hightroughput system of analysis. Sulfonamide analysis can be easily performed in CE systems [20-26]
4 and several methods are disposable for this purpose, which are recently reviewed [27]. But in all of
5 those methods, high number of extraction, concentration and purification steps is necessary, like solid-
6 phase extraction (SPE) or more laborious approach.

7
8 According to legal requirements for performance of analytical methods for residues determination in
9 food, a confirmatory method is necessary after the detection and or quantification of an analyte trough
10 the so-called “non-confirmatory methods” as high performance liquid chromatography, gas
11 chromatography and capillary electrophoresis.

12
13 For this purpose, mass spectrometry is generally the better choice, which is presented in hyphenated
14 methods, like liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometers (LC-MS and GC-MS,
15 respectively), capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS) or in tandem mass
16 configuration *e.g.* LC-MS/MS.

17
18 Method validation is a totally necessary tool for residues analysis, because the important role in
19 statutory programs involved in international trade of commodities. European Union (EU) has issued
20 a specific regulation decision (2002/657/EC) concerning the performance of methods and the
21 interpretation of results in the official control of residues in products of animal origin. Several
22 parameters must be calculated as limit of decision ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$). For this study,
23 we applied a validation process based in this regulation.

24
25 In this work, we showed the development and validation of an analytical system for hightroughput
26 analysis of sulfonamide residues in animal tissues, composed by a screening method and a
27 confirmatory method, performed by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection
28 and a LC-MS/MS system, respectively.

30 31 **2. Experimental**

32 33 34 **2.1 Capillary Electrophoresis**

35
36 Initially, we used an instrumental setup which has been described in detail by Hillebrand [28, 29]. A
37 UV LED (HR370A; Sander Eletronic, Berlin, Germany) with maximum emission at 370 nm ($\Delta\lambda = 12$
38 nm) was used as excitation source. The signal from the photomultiplier tube (PMT) (model E850-02;
39 Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA) was enhanced by an adjustable gain amplifier (13 AMP 003;
40 Melles Griot, Boulder, CO, USA) before integration by a boxcar (model 162/164; Princeton Applied
41 Research, Princeton, NJ, USA). By means of a data acquisition board (CIO-DAS08; Computer Boards,
42 Mansfield, MA, USA), the resulting signal was transferred to a PC using a locally written HP VEE
43 routine. A function generator (CFG250; Tektronix, Beaverton, OR, USA) was used for both driving the
44 LED and generating a trigger signal to the boxcar integrator. The homemade CE instrument was
45 equipped with a fused-silica capillary with an ID of 50 μm , an OD 375 μm , and a total length of 59 cm
46 (54 cm to the detector). After development of the method, we used a commercial capillary
47 electrophoresis system with twelve capillaries and equipped with a laser-induced fluorescence (LIF)

1 detector model PNA402mc (IS Biotech, Porto Alegre, Brazil). Background electrolyte was composed
2 by phosphate buffer 20 mM and sodium dodecyl sulphate (SDS) 40 mM pH 7.5.

3 4 2.2 LC-MS/MS

5
6 LC-MS/MS system used was an API 5000 mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA).
7 Analytical column was a Luna C18 150 X 2.1 mm (Phenomenex, Torrance, CA). Pre-column used was
8 a guard cartridge system composed by a C18 cartridge with 4.0 X 3.0 mm (Phenomenex). The mobile
9 phase consisted in ammonium acetate 10 mM with 0.1% acetic acid (solvent A) and methanol (solvent
10 B). A gradient was used, which are demonstrated in table 1. In initial conditions, was used 25% of
11 solvent B in solvent A; hold for 3 minutes. In the following step, solvent B concentration was
12 increasing to 90% in 1 minute and decrease again to 25% in 2 minutes, for a total time of 6 minutes for
13 each run with a equilibrium time of 3 minutes in the same initial conditions. Mobile phase flow was
14 800 μ L for minute; volume of injection was 20 μ L. Analytes were introduced in mass spectrometer
15 through an electrospray probe operating in positive mode. All data were processed by software Analyst
16 version 1.4.2 (Applied Biosystems).

17
18 *Table 1.*

19 20 21 2.3 Materials

22
23 Except when indicated, all reagents were HPLC grade. HPLC purity water was obtained from Milli-Q
24 purification unit (Millipore, Bedford, MA, USA). For mobile phase, solvents were filtered through a
25 0.22 μ m nylon membrane filter (Millipore) and sonicated before use.

26
27 Analytical standards of sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfamethazine (SMZ),
28 sulfamethoxazole (SMA), sulfadimethoxine (SDMX) and sulfapyridine (SPY) were obtained from
29 Sigma and sulfaquinoxaline (SQX) were obtained from Fluka. Physico-chemical properties of the
30 analytes [30, 31] are showed in table 2. Acetonitrile, acetone and ammonium acetate was obtained from
31 J.T. Baker. Methanol was obtained from Merck. Fluorescamine was obtained from Sigma. Stock
32 solutions were made by dilution of the standards with methanol to a concentration of 1 mg mL⁻¹. Work
33 solutions were made by dilution of the stock solutions with methanol or ammonium acetate
34 10mM/methanol (75/25) to the appropriate concentrations.

35
36 *Table 2.*

37 38 2.4 Sample preparation

39
40 For extraction, a 2.5 g of chopped and homogenized liver tissue were weighted in a 50 mL glass
41 beaker. Internal standard (SPY) were added to a concentration of 100 ng g⁻¹. Approximately 3.0 g of
42 anhydride sodium sulphate were added to the tissue and mixed with a glass stick. An aliquot of 10 mL
43 of acetonitrile was added and the mixture was placed in a head-to-head agitator for 30 minutes. After,
44 the mixture was centrifuged for 20 minutes at 4000 g. The supernatant was transferred to an empty and
45 clean glass tube. The solid residue was submitted to an additional acetonitrile extraction (5 mL) and the
46 extracts were combined before evaporation step. Organic extract was evaporated in a water bath (40-

1 45°C) under a gently flow of nitrogen until dryness. Depending of the analysis type (screening or
2 confirmatory), the dry residue was submitted to one of the process described bellow:

3 4 2.5 Screening method (capillary electrophoresis)

5
6 The dry residue was reconstituted in 1 mL of borate buffer 20 mM pH 9.3. Tubes were vigorously
7 mixed in a tube shaker for 30 seconds. After, the tubes were centrifuged for 5 minutes at 2000 g.
8 Supernatant was filtered using disposable filter units with nylon filters with 0.22 µm porous size.
9 Aliquots of 85 µL of the filtrate were derivatized by addition of 200 mM fluorescamine solution (in
10 acetone) in three aliquots of 5 µL each one. After at a minimum time of 20 minutes, these extracts were
11 deposited in a 96-well plate and processed in the capillary electrophoresis system. For the manually
12 controlled system, injections were made in hydrodynamic mode, with a time of injection of 60 seconds
13 in a height of 6 centimeters. Applied voltage was 20 kV. Electric current showed values around 50±5
14 µA.

15 16 2.6 Confirmatory method (tandem mass spectrometry)

17
18 The dry residue was reconstituted in 2 mL of mobile phase mixture (10 mM ammonium acetate:
19 methanol, 75:25, v/v) and mixed vigorously in a tube shaker for 30 seconds. After, the tubes were
20 centrifuged for 5 minutes at 2000 g. An aliquot of 300 µL of the supernatant was transferred to an
21 empty auto-sampler HPLC vial in which a volume of mobile phase mixture was added to a final
22 volume of 1.5 mL. Aliquots of 20 µL of this diluted extract were injected in the LC-MS/MS system.
23 Identification of analytes was achieved using multiple reaction monitoring (MRM). Parameters are
24 showed in table 3.

25
26 *Table 3.*

27 28 **3. Results and discussion**

29 30 3.1 Analytical conditions

31
32 Analysis of drugs residues in these types of matrices (serum, plasma, tissues, etc.), in general, requires
33 a pre-treatment of the sample. The reasons for this are many, highlighting the complexity of biological
34 matrices, which the compounds are obtained, *e.g.* presence of proteins that are incompatible with the
35 chromatography columns or electrophoretic capillaries; concentration of substances to be analysed in
36 level of trace. The techniques of extraction and pre-concentration enables the analysis of the
37 components of interest becomes possible. The ultimate goal is to obtain a sub-fraction of the original
38 sample enriched with the analytical substance of interest, so as to obtain a separation method free of
39 interfering compounds with appropriate detection and a reasonable time of analysis.

40
41 Liver is a very complex matrix, thus the success probability of an analytical method is much lower than
42 for those matrices like milk or water, for example. The associated use of adequate methods for
43 extraction and concentration of the samples associated with detection systems which show specificity

1 and low detection limits provide a satisfactory performance. In this work, one of the aims was
2 specifically obtain a simple, fast and non-expensive extraction –concentration system. Extraction was
3 performed only with acetonitrile and concentration was obtained through an evaporation step. Other
4 organic solvents were tested for extraction, such as methanol and ethyl acetate but acetonitrile provide
5 the higher recoveries values (upper to 85% to all analytes) and best cleanness of the extracts, probably
6 because acetonitrile show a low number of co-extracted endogenous compounds in comparison with
7 methanol and ethyl acetate. Methanol extraction provides a mean recovery of $65\pm 10\%$ and with ethyl
8 acetate, a mean value of $71\pm 9\%$ was obtained.

9
10 For screening purposes, the dry extract was reconstituted in an alkaline buffer, to provide the optimum
11 media to derivatization procedure with fluorescamine. Capillary electrophoresis is an analytical tool
12 with several advantages as speed, low cost and minimum solvent residues production. But detection
13 limits are generally not satisfactory for drugs residues analysis. To obtain adequate detection limits, a
14 fluorescence detector system was used which can provide the best sensibility of detection in capillary
15 electrophoresis. Besides improve limits of detection, the use of LIF increases the selectivity of the
16 method: matrix interfering substances are excluded, either by derivatization process which is chemical
17 selective and the electrophoretic separation using micellar electrokinetic chromatography (MEKC)
18 mode.

19 20 3.2 Validation

21
22 Method validation was performed by means of intra-day ($n = 6$) and inter-day accuracy and precision
23 ($n = 6$), sensitivity, and linearity. $CC\alpha$ and $CC\beta$ values were calculated by calibration curves approach
24 as describe in the Directive 2002/657/EC. For the screening method, specificity and selectivity were
25 studied. $CC\beta$ for CE method was obtained analyzing spiked samples ($n=20$) in decreasing
26 concentration levels. $CC\beta$ value is that level of concentration in which was obtained a maximum level
27 of 5% for false negative results, which means, only one “not-detected” result in a 20 samples batch.
28 $CC\beta$ values as showed in figure 1. Values of 25 ng g^{-1} were obtained for SDZ and STZ; 50 ng g^{-1} for
29 SMZ, SQX and SDMX; for SMA, $CC\beta$ was established at 75 ng g^{-1} .

30
31 *Figure 1.*

32
33 Confirmatory method has been validated in accordance with Decision 2002/657/EC using spiked
34 samples. Parameters of performance of the method were determined and evaluated according to the
35 considerations proposed in Decision, using samples of liver fortified with standard solution of
36 sulfonamides in various concentrations. The parameters studied: linearity, accuracy, precision,
37 specificity, selectivity, stability of standards, matrix interference, besides the new parameters $CC\alpha$ and
38 $CC\beta$. The linear response was first studied using standard solutions injected three times, covering the
39 range $10\text{-}300 \text{ ng mL}^{-1}$. The calibration curves were constructed using the ratio of peak area of analyte /
40 area of internal standard peak *versus* the concentration of analyte. All curves have been injected at least
41 in triplicate. Precision and accuracy were studied by the analysis of samples fortified with three levels
42 of concentration ($50, 100$ and 150 ng mL^{-1}). The Intra-precision test was studied for six measurements
43 in replicate for the three levels of concentration while the inter-precision test was performed during the
44 execution of three batches into three distinct and consecutive days. The decision limit, $CC\alpha$, and the
45 detection capability, $CC\beta$ were calculated plotting all data obtained from precision study.

46 47 3.3 Specificity

1
2 Blank samples (n = 20) were tested for verification of interference, using the extraction procedure and
3 conditions of electrophoresis and chromatography described. No significant interference in retention
4 times of analytes and internal standard were observed for the matrix liver. Typical electroferograms
5 and chromatograms are shown in figure 2. Figure 3 show samples spiked with pool of six sulfonamides
6 in both electrophoretic and mass spectrometry methods.

7
8 *Figure 2.*

9
10 *Figure 3.*

11 12 3.4 Selectivity

13
14 To evaluate the interference of other co-extracted substances in ionization phenomena, blank samples
15 were fortified with a standard solution (pool) containing the six sulfas analyzed as well as the internal
16 standard (SPY), obtaining concentration equivalent to 100 ng mL⁻¹ for each sulfa. In those samples,
17 were added other drugs commonly used for prophylactic and treatment (listed in the table 4) from
18 different groups.

19
20 This study was done by two different approaches. First, the potential interfering was added in three
21 different levels of concentration in blank samples. In the second approach, repeated the same procedure
22 for the fortification of blank samples with potential interfering compounds and, moreover, has been
23 added to each sample of a pool of sulfas in concentration equivalent to MRL, as described above. The
24 three concentrations of interfering is equivalent to those used for the validation of sulfas, or 0.5, 1.0 and
25 1.5 times the value of the MRL (100 µg kg⁻¹). No one of the studied compounds cause ionic
26 suppression of analyte or internal standard. Thus the lack of statistically significant changes in the
27 quantification of these samples, the non-target substances added were considered not interfering.

28
29 *Table 4.*

30 31 3.5 Stability

32 33 *Stability of the analyte in the matrix*

34 25 grams of a blank sample were weighted and spiked with 1 mL of spiking solution (2.5 µg mL⁻¹).
35 The sample was separated in ten aliquots of 2.5 grams each. These samples were analyzed in duplicate
36 after 7, 14, 30, 60 and 90 days. Samples were identified, labeled and stored in a freezer at -10 °C (at
37 least) until the day of the analysis. By 30 days of storage, there was no significant change in the
38 samples. However, the maximum storage period tolerated for these samples should be stipulated in
39 Brazilian National Residue Control Plan that considers a maximum of 15 days for receipt, analysis and
40 emission of results.

41 42 *Stability of analytes in the extract*

43 A validation batch has been re-injected after three days and remained stored at this time to -20°C. No
44 significant difference was found between the two results. Based on data obtained and in references [5,
45 16, 17, 32], and applying a safety margin expanded, set a validity period of 6 months for stock
46 solutions kept under temperatures below -10°C, 1 month to solutions of concentration below 25 µg mL⁻¹
47 ¹ kept in refrigeration (below 7°C), the analytes are stable in frozen matrices up to a month without

1 perceptible changes, the analytes remains stable in extracts kept under temperatures below -10°C
2 within the study period.

3 4 3.6 Recovery and determination of matrix effect

5
6 Since this method use an internal standardization, recoveries values are not considered to calculations.
7 Using two extractions with acetonitrile, data obtained by comparing areas of peak samples extracted
8 and standards showed average recoveries upper to 85% for all analytes.

9
10 To evaluate the matrix effect, were compared variance values of inclination and intercept of linear
11 regression equations obtained for curves prepared in solvent, in matrix and in samples of tissue
12 standard type, which are extracts of blank samples to which was added an amount of standard solution
13 to obtain a concentration at MRL. The statistical evaluation was performed by Student's test.

14
15 Use of sulfapyridine as internal standard resulted from the fact that this sulfonamide is absence in
16 national pharmaceutical market. Capacity of SPY as internal standard was evaluated by comparison of
17 responses obtained by the sulfonamides and the analytes. In screening method, SPY was also used as a
18 relative retention time marker.

19
20 Considering the results, it appears that only STZ shows no significant difference in three ways of
21 preparing curve. This lead us to make an option for recovery samples calibration curves. This approach
22 takes into account the many variables present in these matrices.

23 24 3.7 Calibration curves

25
26 To define the relationship between concentration and analytical response, a calibration curve with five
27 levels of concentration, discounting the zeros, was prepared for quantification of each matrix studied.
28 For linearity, a matrix-matched curve with nine levels of concentration was analyzed and was linear in
29 studied range (10 to 300 ng g⁻¹), with satisfactory average correlation coefficient (0.9974). Table 5
30 summarizes all data of calibration curves obtained for each matrix. The data obtained meet the criteria
31 for validation of the calibration curve ($R^2 > 0.97$). Statistical tool used to detect outliers was Grubbs
32 test.

33
34 *Table 5.*

35 36 3.8 Precision, accuracy and reproducibility

37
38 Precision and reproducibility data are summarized in table 6. The determination accuracy for 'tissue
39 standard' samples type fortified in the value of the MRL was accompanied in each lot, either for
40 validation studies and analyses of routine and are intended for the construction of control charts for
41 statistical tracking of the process and to provide data for future estimate of the uncertainty of
42 measurement. The average values of accuracy obtained in eleven lots are listed in the table 7.

43
44 *Table 6.*

45
46 *Table 7.*

47 48 3.9 Interlaboratorial repeatability

1
2 During the validation process were carried out analysis of samples provided by the *Instituto*
3 *Zooprofilático da Lombardia* (Italy) as an interlaboratory proficiency test. Although the analysis has
4 been performed in different matrix of our validation process (chicken muscle), the results were very
5 satisfactory, as shown in the table 8.

6
7 *Table 8.*

8 9 **4. Conclusions**

10 A method of analysis of sulfonamides residues by capillary electrophoresis was validated to screening
11 purposes. The method developed is capable to satisfactorily analyze liver samples containing
12 sulfonamides at concentrations above 25 ng g⁻¹. Confirmation of the screening results can be achieved
13 with a LC-MS/MS method, which was fully validated according to 2002/657/EC. Both methods are
14 able to application in the Brazilian National Residue Control Plan to monitoring sulfonamides residues.
15

16 17 **References**

- 18
19
20 [1] G. Domagk, Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1922-1941, Elsevier Publishing
21 Company, Amsterdam, 1965.
22 [2] A.S.J.P.A.M.V. Miert, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17 (1994) 309.
23 [3] J.F. Acar, G. Moulin, *OIE Revue Scientifique et Technique*, 25 (2006) 775.
24 [4] T.M. Wassenaar, *Critical Reviews in Microbiology*, 31 (2005) 155.
25 [5] J. Alaburda, V. Ruvieri, L. Shundo, A.P. De Almeida, P. Tiglea, M. Sabino, *Pesq Agropec Bras*,
26 42 (2007) 1587.
27 [6] N. Furusawa, *Analytica Chimica Acta*, 481 (2003) 255.
28 [7] W.J. Gong, Y.P. Zhang, Y.J. Zhang, G.R. Xu, X.J. Wei, K.P. Lee, *Journal of Central South*
29 *University of Technology (English Edition)*, 14 (2007) 196.
30 [8] K. Kishida, N. Furusawa, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 26
31 (2003) 2931.
32 [9] W. de Keizer, M.E. Bienenmann-Ploum, A.A. Bergwerff, W. Haasnoot, *Analytica Chimica*
33 *Acta*, 620 (2008) 142.
34 [10] J. Adrian, D.G. Pinacho, B. Granier, J.M. Diserens, F. Sanchez-Baeza, M.P. Marco, *Analytical*
35 *and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 1703.
36 [11] M.S. Díaz-Cruz, M.J. Garcia-Galan, D. Barceló, *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 50.
37 [12] R.H.M.M. Granja, A.M.M. Nino, F. Rabone, A.G. Salerno, *Analytica Chimica Acta*, 613 (2008)
38 116.
39 [13] G. Zhang, X. Wang, A. Zhi, Y. Bao, Y. Yang, M. Qu, J. Luo, Q. Li, J. Guo, Z. Wang, J. Yang,
40 G. Xing, S. Chai, T. Shi, Q. Liu, *Food Additives and Contaminants*, 25 (2008) 413.
41 [14] C. Reguera, M.C. Ortiz, A. Herrero, L.A. Sarabia, *Talanta*, 75 (2008) 274.
42 [15] W.F. Smyth, *ELECTROPHORESIS*, 26 (2005) 1334.
43 [16] B. Santos, A. Lista, B.M. Simonet, A. Rios, M. Valcarcel, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1567.
44 [17] J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gamiz-Gracia, C. Cruces-Blanco,
45 *Electrophoresis*, 27 (2006) 4060.
46 [18] G. Font, A. Juan-García, Y. Pico, *Journal of Chromatography A*, 1159 (2007) 233.
47 [19] V. Garcia-Canas, A. Cifuentes, *ELECTROPHORESIS*, 29 (2008) 294.
48 [20] M.C. Ricci, R.F. Cross, *Journal of Microcolumn Separations*, 5 (1993) 207.

- 1 [21] R.F.C. Maria C. Ricci, *Journal of Microcolumn Separations*, 5 (1993) 207.
2 [22] R.F. Cross, J. Cao, *Journal of Chromatography A*, 786 (1997) 171.
3 [23] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, *Journal of Chromatography A*, 768 (1997) 97.
4 [24] C.E. Lin, W.C. Lin, Y.C. Chen, S.W. Wang, *Journal of Chromatography A*, 792 (1997) 37.
5 [25] M.R.S. Fuh, S.Y. Chu, *Analytica Chimica Acta*, 499 (2003) 215.
6 [26] S. Lamba, S.K. Sanghi, A. Asthana, M. Shelke, *Analytica Chimica Acta*, 552 (2005) 110.
7 [27] R.B. Hoff, T.B.L. Kist, submitted to *Journal of Separation Science* (2008).
8 [28] M. Bastiani, S. Hillebrand, F. Horn, T.B.L. Kist, J.A. Guimarães, C. Termignoni, *Insect*
9 *Biochemistry and Molecular Biology*, 32 (2002) 1439.
10 [29] S. Hillebrand, J.R. Schoffen, M. Mandaji, C. Termignoni, H.P.H. Grieneisen, T.B.L. Kist,
11 *Electrophoresis*, 23 (2002) 2445.
12 [30] R.D. Caballero, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque, *Analytical Letters*, 34 (2001)
13 1189.
14 [31] S. Carda-Broch, A. Berthod, *Chromatographia*, 59 (2004) 79.
15 [32] N. Furusawa, R. Hanabusa, *Food Research International*, 35 (2002) 37.

16
17

18 **Figure captions:**

19

20 **Figure 1.** CC β determination for screening method. Cut-off was represented by 19 detected results in
21 20 samples (5% of false negative results).

22

23

24 **Figure 2.** Blank samples. Electropherogram with SPY (a) and an ion chromatogram of the same
25 sample (b). Conditions are describe in Section 2.

26

27

28 **Figure 3.** Chromatograms of recovery samples spiked at MRL (100 ng g⁻¹) analyzed by capillary
29 electrophoresis (a) and LC-MS/MS (b). Conditions are described in Section 2. Peaks are: SDZ (1), STZ
30 (2), SPY (3), SMZ (4), SMA (5), SDMX (6) and SQX (7).

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

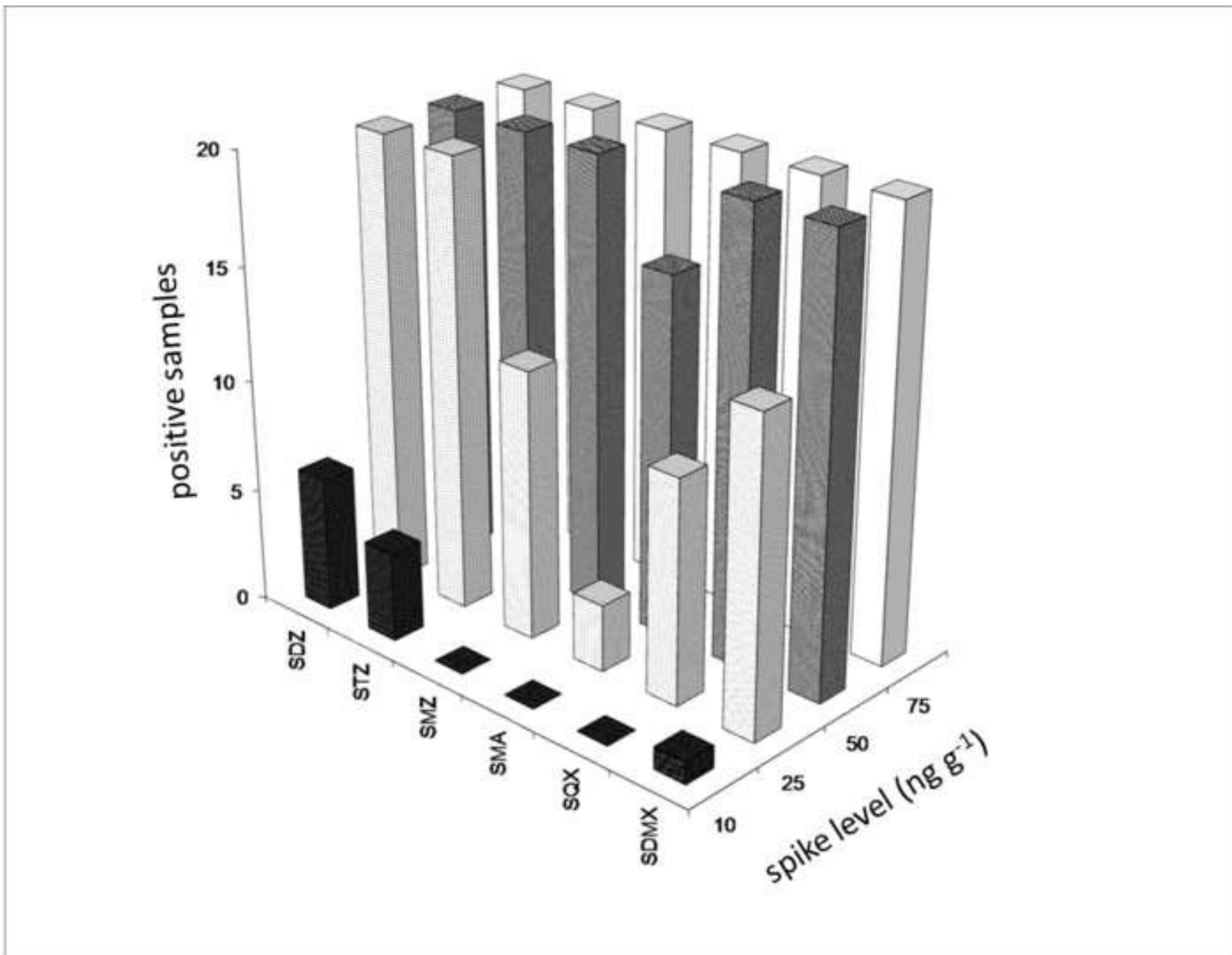


Figure2
[Click here to download high resolution image](#)

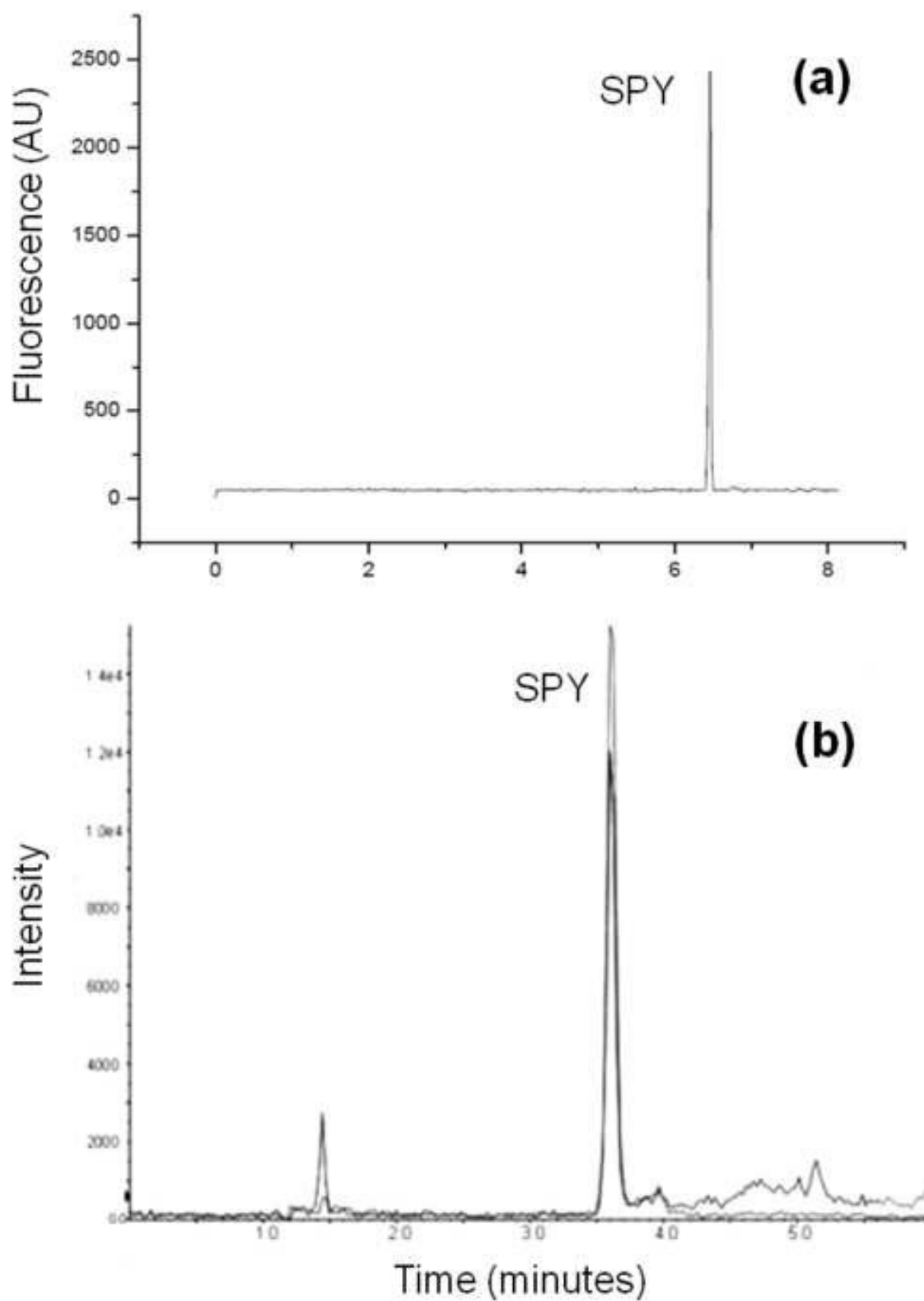


Figure3
[Click here to download high resolution image](#)

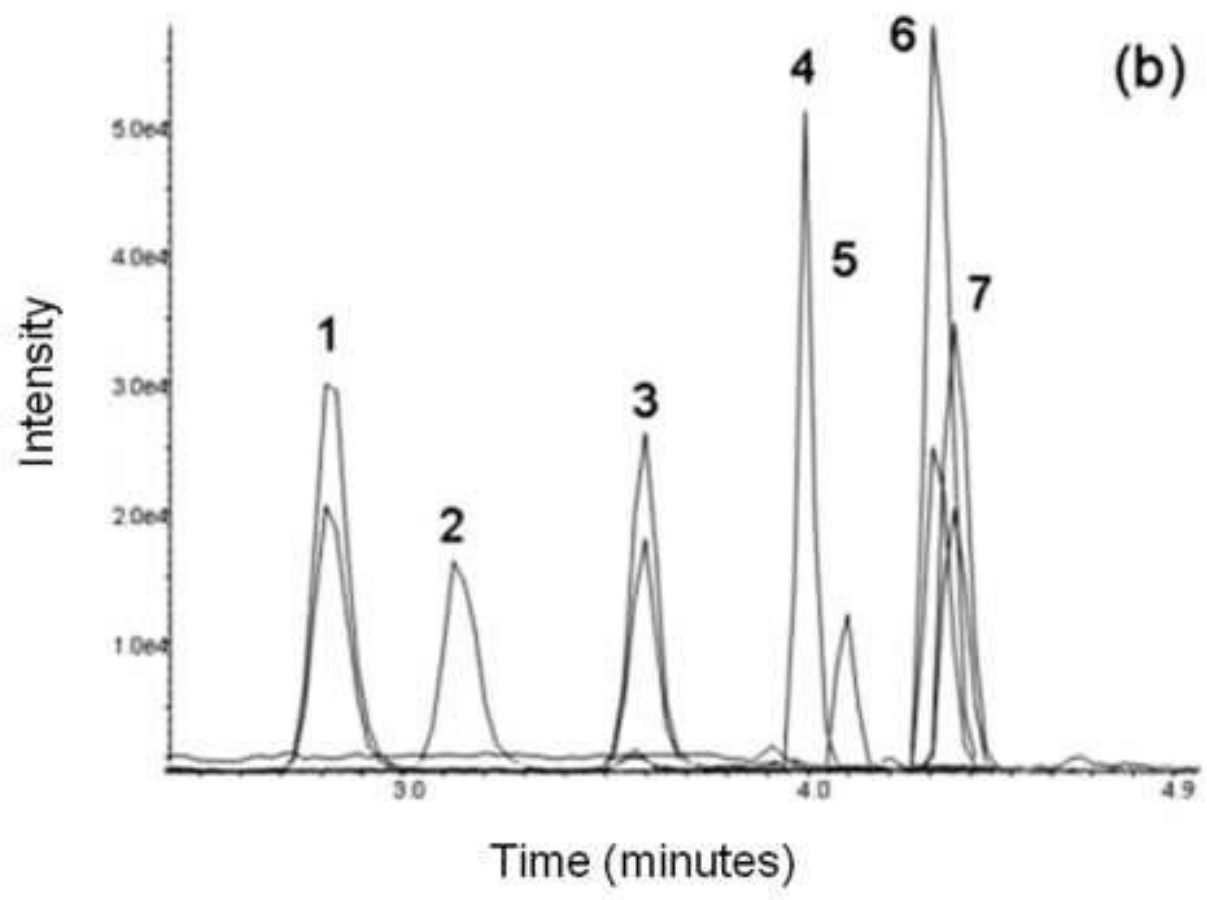
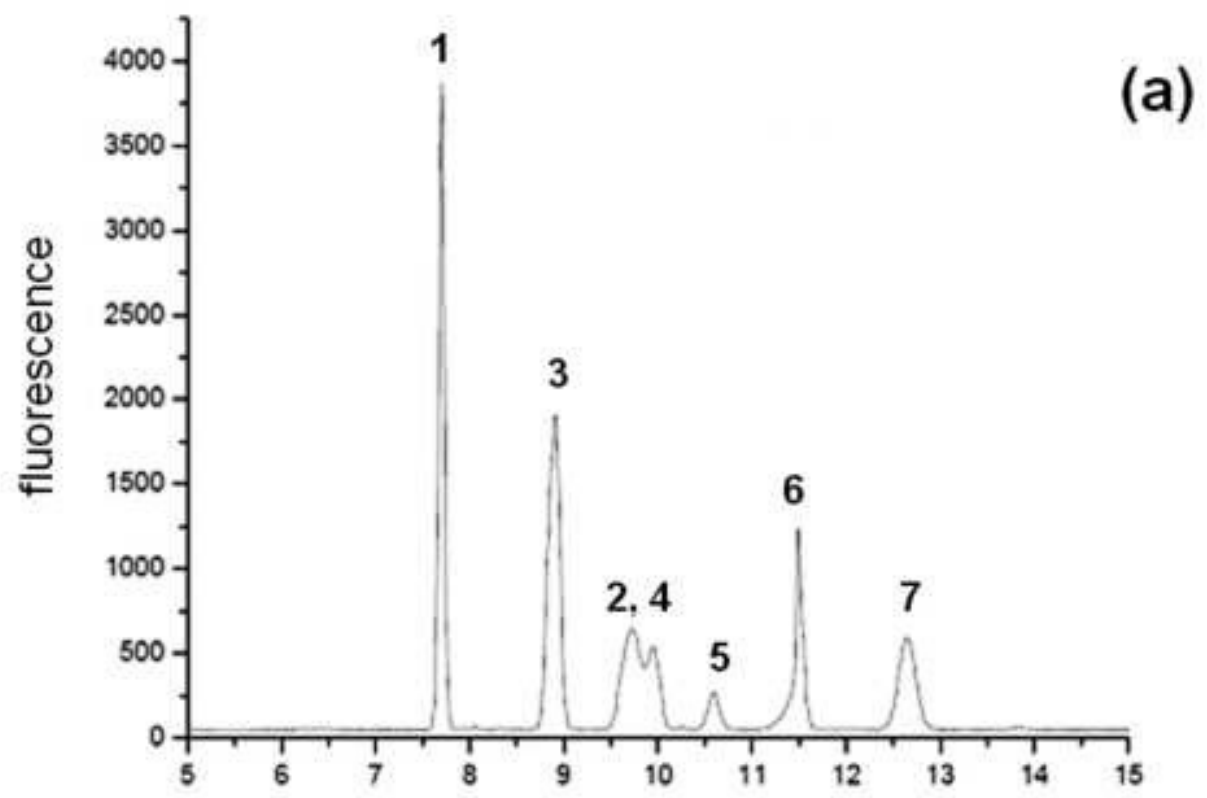


Table 1. Gradient timetable

| Time (min) | A (10mM ammonium acetate) (%) | B (methanol with 0.1% acetic acid) (%) |
|---------------|----------------------------------|-------------------------------------------|
| 0 | 75 | 25 |
| 3 | 75 | 25 |
| 4 | 10 | 90 |
| 6 | 75 | 25 |

Table 2. Physico-chemical properties of the sulfonamides

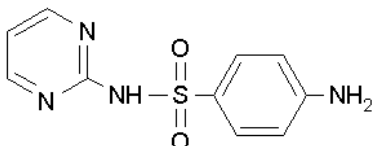
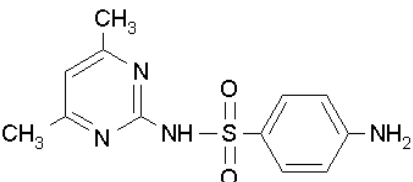
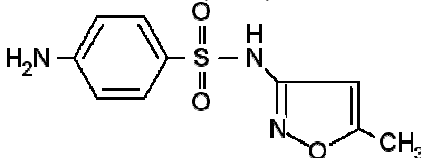
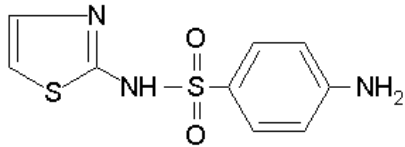
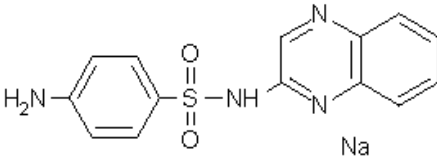
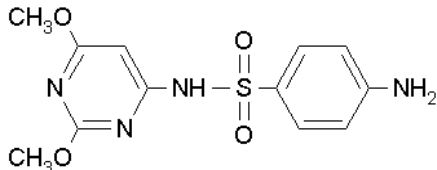
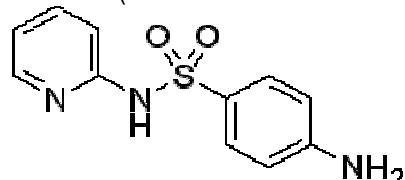
| Sulfonamide | Molecular weight | pKa ₁ | pKa ₂ | LogP (pH 7.0) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| SULFADIAZINE (SDZ)  | 250.29 | 1.98 | 6.01 | -1.05 |
| SULFAMETHAZINE (SMZ)  | 278.34 | 2.46 | 7.45 | 0.14 |
| SULFAMETHOXAZOLE (SMA)  | 253.29 | 1.81 | 5.46 | -0.68 |
| SULFATHIAZOLE (STZ)  | 255.33 | 2.06 | 7.07 | -0.31 |
| SULFAQUINOXALINE (SQX)  | 300.1 | 2.62 | 6.0 | 0.41 |
| SULFADIMETHOXINE (SDMX)  | 310.34 | 3.4 | 5.76 | 0.39 |
| SULFAPYRIDINE (SPY - INTERNAL STANDARD)  | 259.1 | 2.37 | 7.48 | -0.06 |

Table 3. Mass spectrometry analysis parameters

| Compound | Precursor ion [M+H] ⁺ m/z | Transitions observed | Collision voltage (V) | Cone voltage (V) | Typical retention time (min) |
|------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|------------------|------------------------------|
| SDZ | 251 | 251>156 ^b 251>108 | 21 33 | 31 31 | 2.92 |
| STZ | 256 | 256>156 256>108 | 21 37 | 71 71 | 3.15 |
| SPY ^a | 250 | 250>156 250>108 | 25 35 | 46 46 | 3.63 |
| SMZ | 279 | 279>156 279>108 | 25 41 | 31 31 | 4.02 |
| SMA | 254 | 254>156 254>92 | 23 33 | 71 71 | 4.10 |
| SDMX | 311 | 311>156 311>108 | 29 37 | 31 31 | 4.33 |
| SQX | 301 | 301>156 301>108 | 25 37 | 71 71 | 4.41 |

^a Internal standard^b Bold transitions are used for quantitative analysis

Table 4. Compounds utilized for interfering evaluation.

| <i>Compound</i> | <i>Class</i> | <i>Spike levels (ng g⁻¹)</i> |
|------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|
| Trimethoprim | Dihydrofolate reductase inhibitors | 50, 100, 150 |
| Chloramphenicol | Amphenicoles | 50, 100, 150 |
| Clortetraciline | Tetraciclins | 50, 100, 150 |
| Flumequine | Quinolones | 50, 100, 150 |
| Oxolinic acid | Quinolones | 50, 100, 150 |

Table 5. Calibration curves parameters

| Analyte | Average equations | Average squared linear regression coefficient (R ²) |
|---------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| SDZ | $y = 0.974 \pm 0.0043x + (0.0084 \pm 0.00002)$ | 0.9974 |
| STZ | $y = 1.02 \pm 0.00058x + (-0.0038 \pm 0.00037)$ | 0.9964 |
| SMZ | $y = 0.935 \pm 0.00316x + (0.009 \pm 0.00031)$ | 0.9971 |
| SMA | $y = 1.576 \pm 0.0574x + (0.0287 \pm 0.00039)$ | 0.9973 |
| SQX | $y = 2.22 \pm 0.016x + (0.0369 \pm 0.0018)$ | 0.9976 |
| SDMX | $y = 3.426 \pm 0.305x + (0.0605 \pm 0.00179)$ | 0.9979 |

Table 6. Summary of calculated parameters

| Analyte | LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|---------|----------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| SDZ | 100 | 107.9 | 117.5 |
| STZ | 100 | 111.5 | 121.3 |
| SMZ | 100 | 113.8 | 125.4 |
| SMA | 100 | 113.8 | 124.4 |
| SQX | 100 | 121.0 | 135.4 |
| SDMX | 100 | 118.6 | 132.4 |

Table 7. Inter-day and intra-day repeatability parameters

| Analyte | Parameters | Fortification levels (n=6 for each batch; 3 batches for each level) | | | | | | | | |
|---------|------------------|---------------------------------------------------------------------|-----|-----|------------------------|-----|-----|------------------------|-----|-----|
| | | 50 ng g ⁻¹ | | | 100 ng g ⁻¹ | | | 150 ng g ⁻¹ | | |
| SDZ | Average value | 52 | 53 | 51 | 98 | 97 | 99 | 144 | 152 | 150 |
| | RSD | 2.7 | 2.1 | 3.8 | 7.8 | 4.5 | 5.5 | 5.7 | 5.0 | 6.7 |
| | CV (%) | 5.1 | 4.0 | 7.5 | 8.0 | 4.7 | 5.5 | 4.0 | 3.3 | 4.5 |
| | Inter-day (CV %) | 5.23 | | | | | | | | |
| SDMX | Average value | 42 | 43 | 46 | 82 | 80 | 91 | 118 | 123 | 130 |
| | RSD | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 12.0 | 3.7 | 4.2 | 4.3 | 2.1 | 4.2 |
| | CV (%) | 4.8 | 2.4 | 6.7 | 14.6 | 4.7 | 4.6 | 3.7 | 1.7 | 3.2 |
| | Inter-day (CV %) | 6.93 | | | | | | | | |
| SMZ | Average value | 49 | 49 | 50 | 99 | 91 | 101 | 136 | 141 | 148 |
| | RSD | 2.5 | 2.1 | 3.7 | 8.0 | 4.2 | 4.9 | 6.4 | 2.3 | 5.9 |
| | CV (%) | 5.1 | 4.3 | 7.3 | 8.1 | 4.6 | 4.9 | 4.7 | 1.6 | 4.0 |
| | Inter-day (CV %) | 5.86 | | | | | | | | |
| SMA | Average value | 45 | 46 | 46 | 86 | 84 | 92 | 126 | 128 | 132 |
| | RSD | 2.9 | 1.4 | 3.8 | 9.4 | 4.2 | 3.6 | 4.7 | 2.1 | 6.0 |
| | CV (%) | 6.3 | 3.2 | 8.2 | 10.9 | 5.0 | 3.9 | 3.7 | 1.6 | 4.6 |
| | Inter-day (CV %) | 5.81 | | | | | | | | |
| SQX | Average value | 36 | 35 | 39 | 66 | 66 | 77 | 100 | 102 | 104 |
| | RSD | 2.6 | 0.7 | 2.3 | 10.8 | 3.9 | 2.9 | 5.0 | 2.4 | 4.9 |
| | CV (%) | 7.3 | 1.9 | 5.9 | 16.4 | 5.9 | 3.8 | 5.0 | 2.4 | 4.7 |
| | Inter-day (CV %) | 7.73 | | | | | | | | |
| STZ | Average value | 50 | 50 | 50 | 96 | 91 | 95 | 136 | 144 | 136 |
| | RSD | 2.2 | 1.7 | 3.8 | 9.0 | 4.8 | 4.6 | 4.9 | 2.1 | 3.0 |
| | CV (%) | 4.4 | 3.4 | 7.7 | 9.4 | 5.3 | 4.9 | 3.6 | 1.5 | 2.2 |
| | Inter-day (CV %) | 5.2 | | | | | | | | |

Table 8. Accuracy values for determination of samples spiked at MRL (n =11).

| Analyte | Accuracy average values (%) |
|---------|-----------------------------|
| SDMX | 104 |
| SDZ | 105 |
| SMA | 108 |
| SMZ | 101 |
| SQX | 107 |
| STZ | 101 |

Table 9. Results for proficiency test

| Control sample | Analyte | Concentration (ng g ⁻¹) | z-score ^a |
|----------------|---------|-------------------------------------|----------------------|
| Chicken muscle | SDZ | 85.0 | 0.3 |
| | SDMX | 56.0 | 1.8 |

^aResults in conformity when z-score values between -2.0 and 2.0.

9. CONCLUSÕES

- a. A eletroforese capilar mostra-se uma ferramenta analítica promissora para análise de resíduos de fármacos em alimentos, especialmente para espécies químicas com características físico-químicas anfóteras, como é o caso das sulfonamidas.
- b. Propôs-se uma nova abordagem para elencar e priorizar fármacos com potencial de deixar resíduos em alimentos e no ambiente.
- c. Um método de análise de resíduos de sulfonamidas utilizando eletroforese capilar foi desenvolvido, demonstrando rapidez, baixo custo, seletividade e sensibilidade adequadas para ser utilizado como método de triagem.
- d. Foi desenvolvido e validado um método confirmatório utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, sendo este método validado de acordo com a legislação pertinente.
- e. Os métodos desenvolvidos serão propostos ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como método oficial de análise.

10. Referências Bibliográficas

Acar, J.F., Moulin, G., 2006. Antimicrobial resistance at farm level. OIE Revue Scientifique et Technique 25, 775-792.

Ackermans, M.T., Beckers, J.L., Everaerts, F.M., Hoogland, H., Tomassen, M.J.H., 1992. Determination of sulphonamides in pork meat extracts by capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography 596, 101-109.

Adrian, J., Pinacho, D.G., Granier, B., Diserens, J.M., Sanchez-Baeza, F., Marco, M.P., 2008. A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and β -lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391, 1703-1712.

Alaburda, J., Ruvieri, V., Shundo, L., De Almeida, A.P., Tiglea, P., Sabino, M., 2007. Sulfonamides in milk by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. Pesq Agropec Bras 42, 1587-1592.

Anadon, A., Arnold, D., Boisseau, J., Boobis, A.R., Ellis, R., Greenlees, K., McLean, J.G., MacNeil, J., Rojas Martinez, J.L., Mitema, E.S., Palermo-Neto, J., Soback, S., Stephany, R.W., 2002. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. World Health Organization - Technical Report Series.

Anadon, A., Arnold, D., Boobis, A., Ellis, R., Fernandez Suarez, A., Greenlees, K., MacNeil, J., McLean, J.G., Palermo-Neto, J., Rojas Martinez, J.L., Sanders, P., Swan, G.E., Wongtavatchai, J., Bruno, A., Cerniglia, C.E., De Lourdes Costarrica, M., Friedlander, L.G., Iseki, N., Jeong, S.H., Lewicki, J., McEwen, S., Ozawa, S., Reeves, P., Ritter, L., Roberts, G., Sheffer, M., Sundlof, S., Tritscher, A., Wennberg, A., 2006. Sixty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization - Technical Report Series, pp. 1-80.

Appelgren, L.E., Arnold, D., Baggot, J.D., Boisseau, J., Boobis, A.R., Boorman, G., Ellis, R.L., Kinabo, L.D.B., McLean, J.G., MacNeil, J.D., Miller, M.A., Mitema, E.S., Montes Nino, A.M., Palermo-Neto, J., Shojaee AliAbadi, F., Stephany, R.W., Cerniglia, C.E., Franceschi, S., Gaylor, D.W., Heitzman, R.J., Herrman, J.L., Leighton, J., Livingston, R.C., McGregor, D.B., Mitsumori, K., Morgan, M.R.A., Olsen, P., Pronk, M.E.W., Ritter, L., Roestel, B., Soback, S., Sundlof, S., Ungemach, F.R., Weatherwax, J., Weber, N., Wells, R., Zmudski, J., 2000. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. World Health Organization - Technical Report Series.

Appelgren, L.E., Arnold, D., Boisseau, J., Ellis, R., Francis, P.G., Furrow, R.D., Hailemariam, Z., Livingston, R.C., McLean, J.G., MacNeil, J.D., Marshall, B.L., Palermo-Neto, J., Pinter, A., Rojas-Martinez, J.L., Sinhaseni, P., Soback, S., Rico, A., 1998. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. World Health Organization - Technical Report Series.

Arnold, D., Boobis, A.R., Ellis, R., Fernandez Suarez, A., Greenlees, K., Kinabo, L.D.B., MacNeil, J., McLean, J.G., Mitema, E.S., Moulin, G., Palermo-Neto, J., Rojas Martinez, J.L., Soback, S., 2004. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. World Health Organization - Technical Report Series.

Bastiani, M., Hillebrand, S., Horn, F., Kist, T.B.L., Guimarães, J.A., Termignoni, C., 2002. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1439-1446.

Bateman, K.P., Locke, S.J., Volmer, D.A., 1997. Characterization of Isomeric Sulfonamides Using Capillary Zone Electrophoresis Coupled with Nano-Electrospray Quasi-MS/MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 32, 297-304.

Bernstein, J.E., Lorincz, A.L., 1981. Sulfonamides and sulfones in dermatologic therapy. *International Journal of Dermatology* 20, 81-88.

Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A., Kay, P., Noble, H., 2005. Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2192-2201.

Blackwell, P.A., Lutzhoft, H.C.H., Ma, H.P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P., 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058-1064.

Blanchflower, W.J., Rice, D.A., 1988. Extraction of sulfamethazine from feed samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 71, 302-303.

Bloom, R., 2004. Use of veterinary pharmaceuticals in the United States. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects, and Risks*.

Booth, N.H., McDonald, L.E., 1992. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. Guanabara Koogan Rio de Janeiro.

Boxall, A.B.A., 2004. The environmental side effects of medication - How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health? *Embo Reports* 5, 1110-1116.

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

Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., Croxford, A., 2004a. Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 180 180, 1-91.

Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Pemberton, E.J., Kolpin, D.W., Baird, D.J., 2004b. Prioritization, modeling and monitoring of veterinary medicines in the UK environment. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 228, U617-U617.

Boxall, A.B.A., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., Levy, L.S., 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2288-2297.

Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sorensen, B., Tolls, J., 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science & Technology* 37, 286A-294A.

BRASIL, 2000. Normas e Padroes de Nutrição e Alimentação Animal, revisao 2000. In: da Agricultura, P.e.A.M.S.D. (Ed.), Brasília, pp. 17-33.

Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J.M., 1982. Use of trimethoprim alone or in combination with drugs other than sulfonamides. *Reviews of Infectious Diseases* 4, 402-410.

Caballero, R.D., Carda-Broch, S., Garcí?a-A?lvarez-Coque, M.C., 2001. Hydro-organic and micellar-organic reversed-phase liquid chromatographic procedures for the evaluation of sulphonamides in pharmaceuticals. *Analytical Letters* 34, 1189-1203.

Campagnolo, E.R., Johnson, K.R., Karpati, A., Rubin, C.S., Kolpin, D.W., Meyer, M.T., Esteban, J.E., Currier, R.W., Smith, K., Thu, K.M., McGeehin, M., 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale

swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment* 299, 89-95.

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

Carda-Broch, S., Berthod, A., 2004. Countercurrent Chromatography for the Measurement of the Hydrophobicity of Sulfonamide Amphoteric Compounds. *Chromatographia* 59, 79-87.

Chattopadhyay, R., Mahajan, B., Kumar, S., 2007. Assessment of safety of the major antimalarial drugs. *Expert Opinion on Drug Safety* 6, 505-521.

Cifuentes, A., 2006. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *ELECTROPHORESIS* 27, 283-303.

COELHO, V.R.P., 2000. Programa Nacional da Melhoria da Qualidade do Leite. FZEA. USP, São Paulo.

Connor, E.E., 1998. Sulfonamide antibiotics. *Primary Care Update for OB/GYNS* 5, 32-35.

Cooper, C., Sherratt, T., Boxall, A., 2002. Modelling the impact of residues of ectoparasiticides and endoparasiticides in livestock dung on populations of dung flora and fauna: Phase 1. Report to English Nature.

Cordle, M.K., 1989. Sulfonamide residues in pork: past, present, and future. *Journal of animal science* 67, 2810-2816.

Costa-Batllo, P., 1996. Sulphonamides as therapeutical agents. *Las sulfonamidas: Actualidad como agentes terapeuticos* 13, 585-589+592.

COSTA, E.O., 1999. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. (Eds.) *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Guanabara Koogn, Rio de Janeiro pp. p.422-433.

Cribb, A.E., Lee, B.L., Trepanier, L.A., Spielberg, S.P., 1996. Adverse reactions to sulphonamide and sulphonamide-trimethoprim antimicrobials: Clinical syndromes and pathogenesis. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews* 15, 9-50.

Cross, R.F., 2001. Joule heating calculations in capillary zone electrophoresis. Reply to "Recalculation of the temperature inside capillaries using high buffer concentrations" by Zhang et al. *Journal of Chromatography A* 907, 357-360.

Cross, R.F., Cao, J., 1997. Salt effects in capillary zone electrophoresis. I. Dependence of electrophoretic mobilities upon the hydrodynamic radius. *Journal of Chromatography A* 786, 171-180.

Cross, R.F., Cao, J., 1998a. Erratum: Salt effects in capillary electrophoresis. I. Dependence of electrophoretic mobilities upon the hydrodynamic radius (*Journal of Chromatography* (1997) 786 (171-180)). *Journal of Chromatography A* 806, 365.

Cross, R.F., Cao, J., 1998b. Salt effects in capillary zone electrophoresis II. Mechanisms of electrophoretic mobility modification due to Joule heating at high buffer concentrations. *Journal of Chromatography A* 809, 159-171.

Cross, R.F., Cao, J., 1998c. Salt effects in capillary zone electrophoresis. III. Systematic and selective factors in the high ionic strength separation of sulphonamides in sodium phosphate buffers. *Journal of Chromatography A* 818, 217-229.

Cross, R.F., Cao, J., 1999. Salt effects in capillary zone electrophoresis IV. Resolution versus time and the effect of potassium phosphate and its concentration in the high ionic strength separation of sulphonamides. *Journal of Chromatography A* 849, 575-585.

D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D., 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374-377.

Dang, Q.X., Sun, Z.P., Ling, D.K., 1992. Separation of sulphonamides and determination of the active ingredients in tablets by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography* 603, 259-266.

de Keizer, W., Bienenmann-Ploum, M.E., Bergwerff, A.A., Haasnoot, W., 2008. Flow cytometric immunoassay for sulfonamides in raw milk. *Analytica Chimica Acta* 620, 142-149.

Diaz-Cruz, M.S., Garcia-Galan, M.J., Barcelo, D., 2008. Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1193, 50-59.

DOMAGK, G., 1965. Further Progress in Chemotherapy of Bacterial Infections. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1922-1941. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

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

Dube, S., Smith, R., 2001. Separation of sulfonamides by capillary electrochromatography. *Chromatographia* 53, 51-56.

Duijkeren, E.V., Vulto, A.G., Miert, A.S.J.P.A.M.V., 1994. Trimethoprim/sulfonamide combinations in the horse: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 17, 64-73.

Emmerich, I.U., Ungemach, F.R., 2004. Approved drugs for pets (except dog and cats). *Zugelassene Arzneimittel für Heimtiere* 32, 329-340.

Esiobu, N., Armenta, L., Ike, J., 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Health Research* 12, 133-144.

Fan, L.Y., Chen, H.L., Chen, X.G., Hu, Z.D., 2003. Separation and determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations by a microfluidic capillary electrophoresis system with a continuous sample introduction interface. *Journal of Separation Science* 26, 1376-1382.

Fayer, R., Ungar, B.L.P., 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews* 50, 458-483.

Floate, K.D., Spooner, R.W., Colwell, D.D., 2001. Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. *Medical and Veterinary Entomology* 15, 117-120.

Font, G., Juan-Garcia, A., Pico, Y., 2007. Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for

the determination of sulfonamide residues in meat. *Journal of Chromatography A* 1159, 233-241.

Fuh, M.R.S., Chu, S.Y., 2003. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* 499, 215-221.

Fullerton, F.R., Kushmaul, R.J., Suber, R.L., Littlefield, N.A., 1987. Influence of oral administration of sulfamethazine on thyroid hormone levels in Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 22, 175-185.

Furusawa, N., 1998. Absorbability of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine administered via food of laying hens. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 45, 267-269.

Furusawa, N., 2003a. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents. *Chromatographia* 57, 317-320.

Furusawa, N., 2003b. A clean and rapid liquid chromatographic technique for sulfamethazine monitoring in pork tissues without using organic solvents. *Journal of Chromatographic Science* 41, 377-380.

Furusawa, N., 2003c. 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.

Furusawa, N., Hanabusa, R., 2002. Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. *Food Research International* 35, 37-42.

Furusawa, N., Mukai, T., 1994. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of residual sulphamonomethoxine, sulphadimethoxine and their N4-acetyl metabolites in foods of animal origin. *Journal of Chromatography A* 677, 81-85.

Furusawa, N., Mukai, T., 1995. Transfer of dietary sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine into various tissues of laying hens. *British poultry science* 36, 313-316.

Furusawa, N., Tsuzukida, Y., 1998. Tissue concentrations of sulphaquinoxaline administered in the food of laying hens. *British Poultry Science* 39, 683-685.

Garcia-Canas, V., Cifuentes, A., 2008. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *ELECTROPHORESIS* 29, 294-309.

Garcia-Ruiz, C., Marina, M.L., 2006. Recent advances in the analysis of antibiotics by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 27, 266-282.

Gavalchin, J., Katz, S.E., 1994. The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *J AOAC Int* 77, 481-485.

Geiser, L., Henchoz, Y., Galland, A., Carrupt, P.A., Veuthey, J.L., 2005. Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure. *Journal of Separation Science* 28, 2374-2380.

Gong, W.J., Zhang, Y.P., Zhang, Y.J., Xu, G.R., Wei, X.J., Lee, K.P., 2007. Optimization strategies for separation of sulfadiazines using Box-Behnken design by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Central South University of Technology (English Edition)* 14, 196-201.

Granja, R.H.M.M., Nino, A.M.M., Rabone, F., Salerno, A.G., 2008. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. *Analytica Chimica Acta* 613, 116-119.

Hafez, H.M., 2003. Emerging and re-emerging bacterial diseases in poultry: A review. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 90, 174-181.

Haller, M.Y., Müller, S.R., Mc Ardell, C.S., Alder, A.C., Suter, M.J.F., 2002. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952, 111-120.

Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Hofer, H., Nau, H., 2005. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 861-868.

Hanna, M., de Biasi, V., Bond, B., Salter, C., Hutt, A.J., Camilleri, P., 1998. Estimation of the Partitioning Characteristics of Drugs: A Comparison of a Large and Diverse Drug Series Utilizing Chromatographic and Electrophoretic Methodology. *Anal Chem* 70, 2092-2099.

Hernandez, M., Borrull, F., Calull, M., 2003. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 22, 416-427.

Hillebrand, S., Schoffen, J.R., Mandaji, M., Termignoni, C., Grieneisen, H.P.H., Kist, T.B.L., 2002. Performance of an ultraviolet light-emitting diode-induced fluorescence detector in capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 23, 2445-2448.

Hirakawa, K., Iida, M., Fuchigami, T., Murata, S., Matsumoto, T., Fujishima, M., 1995. Sulfamethizole absorption test for the assessment of gastric emptying. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 30, 133-138.

Hoff, R.B., Kist, T.B.L., 2008. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis: a review. *Porto Alegre*.

Hows, M.E.P., Perrett, D., Kay, J., 1997. Optimisation of a simultaneous separation of sulphonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and b-lactam antibiotics by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 768, 97-104.

Ibezim, E.C., Odo, U., 2008. Current trends in malarial chemotherapy. *African Journal of Biotechnology* 7, 349-356.

Iyer, H.V., 2008. History Revisited-Prontosil Red. *Journal of Emergency Medicine*.

Jalali-Heravi, M., Garkani-Nejad, Z., 2001. Prediction of electrophoretic mobilities of sulfonamides in capillary zone electrophoresis using artificial neural networks. *Journal of Chromatography A* 927, 211-218.

Johansson, I.M., Pavelka, R., Henion, J.D., 1991. Determination of small drug molecules by capillary electrophoresis-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 559, 515-528.

Jouyban, A., Yousefi, B.H., 2003. A quantitative structure property relationship study of electrophoretic mobility of analytes in capillary zone electrophoresis. *Computational Biology and Chemistry* 27, 297-303.

Joyner, L.P., 1981. The chemotherapy of protozoal infections of veterinary importance. *Journal of Protozoology* 28, 17-19.

Julian, R.J., 2005. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry - A review. *Veterinary Journal* 169, 350-369.

Kaliszan, R., Turowski, M., Bucinski, A., 1995. Quantitative structure-retention relationships in capillary electrophoresis of inorganic cations and β -adrenolytic and sulfonamides compounds. *Quantitative Structure-Activity Relationships* 14, 356-361.

Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A., 2005. A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data. *Environmental Pollution* 134, 333-341.

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

Kishida, K., Furusawa, N., 2003. Toxic/Harmful Solvents-Free Technique for HPLC Determination of Six Sulfonamides in Meat. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 26, 2931-2939.

Kitano, H., Oda, K., 2006. Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system. *Molecular Systems Biology* 2.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202-1211.

Kolz, A.C., Moorman, T.B., Ong, S.K., Scoggin, K.D., Douglass, E.A., 2005. Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons. *Water Environment Research* 77, 49-56.

Kools, S.A.E., Moltmann, J.F., Knacker, T., 2008. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50, 59-65.

Korolkovas, A., França, F.F.A.C., 2002. *Dicionário Terapêutico Guanabara 2002/2003*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Korolkovas, A., Tamashiro, K., 1973. Calculation of the molecular orbit. II. Distribution of the charge on p aminobenzoic acid and sulfonamide by the omega technique. *CALCULOS DE ORBITAL MOLECULAR II DISTRIBUICAO DE CARGA NO ACIDO p AMINOBENZOICO E NA SULFANILAMIDA PELA TECNICA OMEGA* 11, 15-30.

Korolkovas, A., Tamashiro, K., 1974a. Calculations of molecular orbit. 3. Electronic density of sulfas by the omega technic. *Ca?lculos de orbital molecular III Densidade eletro?nica nas sulfas pela te?cnica o?mega* 12, 37-51.

Korolkovas, A., Tamashiro, K., 1974b. Molecular orbital calculations. III. Electronic density in sulfonamides determined by the omega technique. *CALCULOS DE ORBITAL MOLECULAR III DENSIDADE ELETRONICA NAS SULFAS PELA TECNICA OMEGA* 12, 37-51.

KREBS, H.A., SPEAKMAN, J.C., 1945. The Effect of pH on the Solubility of Sulphonamides. *PROCEEDINGS OF THE BIOCHEMICAL SOCIETY - 24rd Meeting of the Biochemical Society Leeds, UK*.

Kreuzig, R., Ho?ltge, S., Brunotte, J., Berenzen, N., Wogram, J., Schulz, R., 2005. Test-plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 777-781.

Kuenzel, W.J., Abdel-Maksoud, M.M., Elsasser, T., Proudman, J.A., 2004. Sulfamethazine advances puberty in male chicks by effecting a rapid increase in gonadotropins. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 137, 349-355.

Lamba, S., Sanghi, S.K., Asthana, A., Shelke, M., 2005. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 552, 110-115.

Lee, M.H., Ryu, P.D., 1999. Sanitation and Tissue Residue Problems in High Quality Pork - Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 12, 233-243.

LEITE, M.P.M.B., JOKL, L., 1996. Ocorrência de resíduos de sulfonamidas em produtos cárneos de frigoríficos inspecionados pelo MAARA, de 1990-1994. . *Boletim Soc Bras Ciência Tecnologia Alimentos*, p. 81-86.

Lepri, L., Desideri, P.G., Tanturli, G., 1974. Chromatographic and electrophoretic behaviour of sulphonamides on thin layers of ion exchangers. *Journal of Chromatography* 93, 201-210.

Lin, C.-E., Chang, C.C., Lin, W.C., 1997a. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis III. Citrate buffer as a background electrolyte. *Journal of Chromatography A* 768, 105-112.

Lin, C.E., Lin, W.C., Chen, Y.C., Wang, S.W., 1997b. Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 792, 37-47.

Lin, C.E., Lin, W.C., Chiou, W.C., Lin, E.C., Chang, C.C., 1996. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. I. Influence of buffer pH and electrolyte modifier. *Journal of Chromatography A* 755, 261-269.

Littlefield, N.A., Gaylor, D.W., Blackwell, B.N., Allen, R.R., 1989. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology* 27, 455-463.

Littlefield, N.A., Sheldon, W.G., Allen, R., Gaylor, D.W., 1990. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: Two-generation exposure. *Food and Chemical Toxicology* 28, 157-167.

Lofflin, J., 2005. The antibiotic revolution. *Veterinary Medicine* 100, 12-19.

Lott, A.F., Smither, R., Vaughan, D.R., 1985. Antibiotic identification by high voltage electrophoresis bioautography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 68, 1018-1020.

Luo, J.-w., Chen, H.-w., Zhang, S.-w., 2000. Fast Determination of Active Ingredients in Sulfatrim

Tablets by Capillary Zone Electrophoresis. JOURNAL OF ANALYTICAL SCIENCE 16, 123-126.

Lysons, R.E., Gibbens, J.C., Smith, L.H., 2007. Progress with enhancing veterinary surveillance in the United Kingdom. Veterinary Record 160, 105-112.

MAPA, 1992. Portaria nº 159 In: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P.E.A. (Ed.).

Maria C. Ricci, R.F.C., 1993. Capillary electrophoresis separation of sulphonamides and dihydrofolate reductase inhibitors. Journal of Microcolumn Separations 5, 207-215.

McCracken, D.I., Foster, G.N., 1993. The effect of ivermectin on the invertebrate fauna associated with cow dung. Environmental Toxicology and Chemistry 12, 73-84.

Miert, A.S.J.P.A.M.V., 1994. The sulfonamide-diaminopyrimidine story*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 17, 309-316.

Mitsubishi, S., 1993. DRUG-RESISTANCE IN BACTERIA - HISTORY, GENETICS AND BIOCHEMISTRY. Journal of International Medical Research 21, 1-14.

Mizuno, N., Nishikata, M., Morita, E., Miyake, K., 1986. Gastrointestinal absorption of sulfaguanidine in neonatal and adult rats. Journal of Pharmacobio-Dynamics 9, 787-792.

Mollenhauer, H.P., 1967. The "acceptable daily intake" value as a base for legislative measures regarding food additives. Residue reviews 19, 1-10.

Ng, C.L., Lee, H.K., Li, S.F.Y., 1992. Systematic optimization of capillary electrophoretic separation of sulphonamides. Journal of Chromatography 598, 133-138.

Ng, C.L., Lee, H.K., Li, S.F.Y., 1993. Determination of sulphonamides in pharmaceuticals by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography 632, 165-170.

NTCR, 1988. National Center for Toxicological Research Technical Report Experiment Number 418. National Center for Toxicological Research, Jefferson, AR.

Passantino, A., 2007. Ethical aspects for veterinarians regarding antimicrobial drug use in Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29, 240-244.

Patel, O.G., Mberu, E.K., Nzila, A.M., Macreadie, I.G., 2004. Sulfa drugs strike more than once. *Trends in Parasitology* 20, 1-3.

Peters, P.J., Thigpen, M.C., Parise, M.E., Newman, R.D., 2007. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: Implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Safety* 30, 481-501.

Pleasance, S., Thibault, P., Kelly, J., 1992. Comparison of liquid-junction and coaxial interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to compounds of concern to the aquaculture industry. *Journal of Chromatography* 591, 325-339.

Rashkovan, B.A., Sementovskaia, G.P., 1968. Separate qualitative and quantitative determination of sulfonilamides in mixtures by the method of paper electrophoresis. *Farmatsevtichnyi zhurnal* 23, 50-55.

Reali, A., Ximenes, A., Cuzzolin, L., Fanos, V., 2005. Antibiotic therapy in pregnancy and lactation. *Journal of Chemotherapy* 17, 123-130.

Reguera, C., Ortiz, M.C., Herrero, A., Sarabia, L.A., 2008. Optimization of a FIA system with amperometric detection by means of a desirability function. Determination of sulfadiazine, sulfamethazine and sulfamerazine in milk. *Talanta* 75, 274-283.

Reimerdes, E., Thumim, J.H., 1970. Behavior of sulfanilamides in the body. *Das Verhalten der Sulfanilamide im Organismus* 20, 1171-1179.

Reimerdes, E.H., Seydel, J.K., 1969. Significance of acid stability of sulfonamides for the determination of their N4-metabolites. *Die Bedeutung der Saurestabilitat von Sulfonamiden fur die Bestimmung ihrer N4-Metaboliten* 19, 1863-1868.

Renaud, F.G., Boxall, A.B.A., Toy, R., Robertson, S., 2004. Evaluation of approaches for terrestrial hazard classification. *Chemosphere* 57, 1697-1706.

Ricci, M.C., Cross, R.F., 1993. Capillary electrophoresis separation of sulphonamides and dihydrofolate reductase inhibitors. *Journal of Microcolumn Separations* 5, 207-215.

Ricci, M.C., Cross, R.F., 1996. High performance liquid chromatographic analysis of sulphonamides and dihydrofolate reductase inhibitors. III. The effect of a competing base, and separations with an ion pairing agent. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 19, 2257-2270.

Riviere, J., Lees, P., Elliott, J., Clarke, C., Anadon, A., Baggot, D., Brown, S.A., Burka, J.F., Clarke, C.R., Craigmill, A., Delatour, P., Ferguson, D., Fink-Gremmels, J., Hennessy, D., Horspool, L., Lanusse, C., Landoni, M.F., McKellar, Q., Martinez, M., Nebbia, C.S., Nolan, A., Papich, M.G., Petzinger, E., Sams, R.A., Sarasola, P., Shimoda, M., Sundlof, S., Taylor, P., Toutain, P.L., Vulliet, R., Webb, A., Whittem, T., Witkamp, R.F., 2003. USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs - Antibiotics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26.

Rubin, R.P., 2007. A brief history of great discoveries in pharmacology: In celebration of the centennial anniversary of the founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacological Reviews* 59, 289-359.

Rubinstein, A., 1995. Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 12, 101-149.

Santos, B., Lista, A., Simonet, B.M., Rios, A., Valcarcel, M., 2005. Screening and analytical confirmation of sulfonamide residues in milk by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS* 26, 1567-1575.

Schott, H., Astigarrabia, E., 1988. Isoelectric points of some sulfonamides: Determination by microelectrophoresis and by calculations involving acid-base strength. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 77, 918-920.

Scott Teeter, J., Meyerhoff, R.D., 2003. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research* 93, 45-51.

Scozzafava, A., Owa, T., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., 2003. Anticancer and antiviral sulfonamides. *Current Medicinal Chemistry* 10, 925-953.

Smith, D.A., Jones, R.M., 2008. The sulfonamide group as a structural alert: A distorted story? *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 11, 72-79.

Smyth, W.F., 2005. Recent applications of capillary electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis. *ELECTROPHORESIS* 26, 1334-1357.

Sommer, C., 1992. Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: concentrations and impact on dung fauna. *Bulletin of Entomological Research* 82, 257-264.

Soto-Chinchilla, J.J., Garcia-Campana, A.M., Gamiz-Gracia, L., Cruces-Blanco, C., 2006. Application of capillary zone electrophoresis with large-volume sample stacking to the sensitive determination of sulfonamides in meat and ground water. *ELECTROPHORESIS* 27, 4060-4068.

Spenser, E.L., 2004. Compounding, extralabel drug use, and other pharmaceutical quagmires. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 13, 16-24.

Strong, L., 1992. Avermectins: a review of their impact on insects of cattle dung. *Bulletin of Entomological Research* 82, 265-274.

Strong, L., 1993. Overview: The impact of avermectins on pastureland ecology. *Veterinary Parasitology* 48, 3-17.

Strucinski, P., Goralczyk, K., Czaja, K., Hernik, A., Korcz, W., Ludwicki, J.K., 2007. Consumer risk assessment in case of maximum residue levels (MRLs) violations in food. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 58, 377-388.

Struller, T., 1968. Progress in sulfonamide research. *Progress in Drug Research* 12, 389-457.

Van Der Ven, A.J.A.M., Vree, T.B., Koopmans, P.P., Van Der Meer, J.W.M., 1997. Metabolites and side effects of trimethoprim-sulfonamide combinations. *Chemotherapie Journal* 6, 28-30.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O., 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66-74.

Veraart, J.R., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N.H., Brinkman, U.A.T., 1999. At-line solid-phase extraction coupled to capillary electrophoresis: Determination of amphoteric compounds in biological samples. *HRC Journal of High Resolution Chromatography* 22, 183-187.

Veraart, J.R., Van Hekezen, J., Groot, M.C.E., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N.H., Brinkman, U.A.T., 1998. On-line dialysis solid-phase extraction coupled to capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 19, 2944-2949.

Wall, R., Strong, L., 1987. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature* 327, 418-421.

Wang, A., Gong, F., Li, H., Fang, Y., 1999. Separation and determination of the active ingredients in tablets of composite sulphonamides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta* 386, 265-269.

Wang, S., Zhang, H.Y., Wang, L., Duan, Z.J., Kennedy, I., 2006. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. *Food Additives and Contaminants* 23, 362-384.

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

WHO, 2002. WHO Model Formulary

Wright, G.D., 2007. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 5, 175-186.

Wright, P.B., Dorsey, J.G., 1996. Silver(I)-mediated separations by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography: Argentation electrophoresis. *Analytical Chemistry* 68, 415-424.

Yang, S., Carlson, K., 2003. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research* 37, 4645-4656.

Yao, Y.J., Li, S.F.Y., 1994. Determination of diffusion coefficients by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science* 32, 117-120.

Zhang, G., Wang, X., Zhi, A., Bao, Y., Yang, Y., Qu, M., Luo, J., Li, Q., Guo, J., Wang, Z., Yang, J., Xing, G., Chai, S., Shi, T., Liu, Q., 2008. Development of a lateral flow immunoassay strip for screening of sulfamonomethoxine residues. *Food Additives and Contaminants* 25, 413-423.

Zilles, J., Shimada, T., Jindal, A., Robert, M., Raskin, L., 2005. Presence of macrolide-lincosamide-streptogramin B and tetracycline antimicrobials in swine waste treatment processes and amended soil. *Water Environment Research* 77, 57-62.

11. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO

HOFF, R. B.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Rodrigo Barcellos Hoff

Local e data de nascimento: São Lourenço do Sul, RS, Brasil, 19 de setembro de 1976.

Endereço profissional: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS. Estrada da Ponta Grossa, nº 3036, Bairro Ponta Grossa, CEP 91780-580 – Porto Alegre – RS – Brasil.

Telefone profissional: (51) 3248.2133 **E-mail:** rodrigo.hoff@agricultura.gov.br

2. FORMAÇÃO: Farmácia e Bioquímica (Universidade Católica de Pelotas – UCPel, 1997-2001)

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Extensão universitária em Otimização de Processos e Planejamento Experimental. (Carga horária: 32h).

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Período: maio de 2008.

Veterinary Medicines. (Carga horária: 80h).

Central Science Laboratory, CSL, York, Inglaterra.

Período: dezembro de 2006

Estimativa da Incerteza nas Medições Laboratoriais. (Carga horária: 16h).

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, Brasil.

Período: junho de 2004.

Aplicação da NBR ISO/IEC 17025 em Laboratórios. (Carga horária: 16h).

Fundação de Ciência e Tecnologia, CIENTEC, Brasil.

Período: julho de 2003

Treinamento em análise de pesticidas organoclorados em gordura animal (Carga horária: 24h).

Universidade Jaume I, Castellón, Espanha.

Período: novembro de 2003.

Curso de Cromatografia Gasosa. (Carga horária: 16h).

Perkin-Elmer, ULBRA, Canoas, RS.

Período: janeiro de 2003.

III Curso de BPF de Produtos Veterinários. (Carga horária: 40h).

Ministério da Agricultura, Pecuárias e Abastecimento, MAPA.

Belo Horizonte, MG.

Período: outubro de 2002.

Curso de Formação Profissional Admissional. (Carga horária: 90h).

Ministério da Agricultura, Pecuárias e Abastecimento, MAPA, Brasil.

Brasília, DF

Período: janeiro de 2002.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Primeiro colocado em nível nacional no Concurso Público para Fiscal Federal Agropecuário, realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em novembro de 2001.

5. EXPERIÊNCIA PROFISIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA

Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO/RS.

Vínculo institucional: Servidor Público

Enquadramento Funcional: Fiscal Federal Agropecuário

Desde fevereiro de 2002.

6. ARTIGOS COMPLETOS SUBMETIDOS

KIST, T.B.L., CARRILHO, E., HILLEBRAND, S., **HOFF, R.B.**, RUBENSAUM, G. & MANDAJI, M. Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions I. Analytes with low dpKa/dT crossing a single thermally-induced pH junction in a BGE with high dpH/dT. Submetido para ELECTROPHORESIS.

KIST, T.B.L., **HOFF, R.B.** Determination of thiabendazole residues in avocado and papaya by HPLC with fluorescence detection. Submetido para JOURNAL OF FOOD COMPOSITION ANALYSIS.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

HOFF, R.B., BARRETO, F. Analysis of sulfonamide residues in liver by LC-MS/MS without chemical extraction or clean-up procedures. In: Euroresidue VI, Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, maio de 2008, Egmond aan Zee, HOLANDA.

HOFF, R.B., BARRETO, F., OLIVEIRA, D.L.S. Análise de resíduos de quinolonas em mel, frango e pescado por LC-MS/MS. In: 2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, (BrMass), dezembro de 2007, Campinas, SP.

BARRETO, F., **HOFF, R.B.** Análise de resíduos de cloranfenicol em mel por LC-MS/MS. In: 2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, (BrMass), dezembro de 2007, Campinas, SP.

HOFF, R. B., KIST, T.B.L. Análise de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PGBCM) do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2007, Porto alegre, RS.

HOFF, R. B. An Improved Method for Thiabendazole Residues in Papaya (*Carica papaya* L.) and avocado (*Persea americana*). In: 1st Latin American Pesticide Residue Workshop, maio de 2007, Santa Maria, RS.

HOFF, R. B. Propostas para Programas de Desenvolvimento de Plantas Medicinais e Fitoterapia. In: VII Seminário Estadual Fórum pela Vida - Projeto Plantas Vivas, 2005, Porto Alegre. Fórum pela Vida - Projeto Plantas Vivas - VII Seminário Estadual - agosto de 2005. Porto Alegre : Corag - Assembléia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul, 2005. p. 64-65.

HOFF, R. B. Histórico do monitoramento de resíduos de cloranfenicol em produtos de origem animal executado pelo Ministério da Agricultura. In: XIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2003, Londrina. Revista Brasileira de Toxicologia, 2003. v. 16.

FUNCK, J. B., PRIMO, F. T., BITTENCOURT, M. S., **HOFF, R. B.** Study of pharmaceutical equivalence of tablets containing hydrochlorothiazide. In: Pharmaceutical Congress of the Americas, 2001, Orlando. Pharmaceutical Congress of the Americas - Onsite Program Guide, 2001. p. 91-91.

ROTH, D. E., ROTH, F. L., **HOFF, R. B.** Mecanismos de lesão neuronal a partir do balanço negativo de cobalamina. In: VIII Laboratório de Pesquisa da UCPel, 2000, Pelotas. VIII Laboratório de Pesquisa da UCPel - anais 2000. Pelotas : Educat, 2000. p. 116-116.