



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**EMPREGO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO DE
SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE URINA PELA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO
LÍQUIDO-LÍQUIDO DE MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA OCA (HF-
MMLLE) ACOPLADA AO SISTEMA DE 96 POÇOS PROFUNDOS COM
DETECÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

LUÍSA SCHERNER ZANOTTO

Florianópolis

Julho/2026

Luísa Scherner Zanotto

**EMPREGO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO DE
SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS DE URINA PELA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO
LÍQUIDO-LÍQUIDO DE MEMBRANA MICROPOROSA DE FIBRA OCA (HF-
MMLLE) ACOPLADA AO SISTEMA DE 96 POÇOS PROFUNDOS COM
DETECÇÃO POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5532)

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Coorientador: Dr. Lucas Morés

Florianópolis

Julho/2026

Zanotto, Luísa Scherner

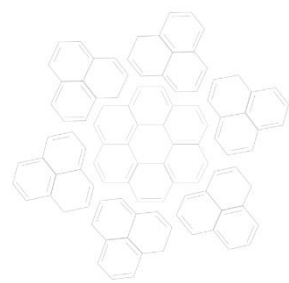
Emprego de solventes eutéticos profundos na extração de sulfonamidas em amostras de urina pela técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) acoplada ao sistema de 96 poços profundos com detecção por cromatografia líquida / Luísa Scherner Zanotto ; orientador, Eduardo Carasek, coorientador, Lucas Morés, 2026.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Química - Bacharelado. 2. DES. 3. HF-MMLLE. 4. sulfonamidas. 5. preparo de amostras. I. Carasek, Eduardo. II. Morés, Lucas. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.



*Dedico este trabalho, com todo o meu amor, aos meus pais,
Marilva e Flávio, que sob o sol forte e a chuva pesada, me
permitiram trilhar meu caminho pela sombra e com água fresca.
Tudo o que sou vem de vocês!*



AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me sustentado durante essa caminhada, me abençoado e me dado forças em todos os momentos, fossem eles bons ou ruins. Minha fé foi grande responsável por ter me trazido até aqui. Por isso, obrigada Papai do Céu.

Agradeço a minha mãe, Marilva, pelo apoio incondicional, por se fazer lar mesmo de longe, através das incontáveis ligações de vídeo e orações. Foram diversos os momentos em que o aperto no peito aparecia por estar longe, e você sempre me incentivou a continuar, com medo ou não, a lutar pelo que eu acreditava que merecia. Mãe, me fiz de você, e sou quem sou por causa de você, se cheguei até aqui, é porque aprendi a voar com você. Obrigada por tudo mamãe, eu te amo!

Agradeço ao meu pai, Flávio. Fui criada por um homem que merecia mais do que jamais recebeu. Meu pai nunca disse que estava cansado, que tinha medo, que não sabia como iria arcar, ele só segue, trabalhando em silêncio, eu cresci achando que ele é invencível, hoje entendo que ele é humano. Com o “pouco” que ele tinha, fez e faz tudo o que pode por mim. Meus pais não são ricos, mas nunca me faltou um teto sob a cabeça, e comida na mesa. Eu te amo paizinho, obrigada por tudo!

Agradeço aos meus irmãos, Caroline e Gabriel. Foram muitas as vezes que a vontade de desistir falou alto, que as emoções não davam pé, e vocês foram a base que eu precisava pra seguir em frente, sempre me lembrando que “a cabeça precisa estar onde os pés estão, senão nada funciona”. Sem vocês, nada disso seria possível, então muito obrigada, de todo o meu coração, vocês são minha inspiração! Eu amo vocês!

A minha família como um todo, em especial aos meus avós, Lourdes, Veneranda e Domingos, que me ensinaram o valor do trabalho suado e honesto, e a força de seguir em frente diante de qualquer que fosse a dificuldade. As saudades são eternas, mas vocês ainda vivem em mim através das incontáveis memórias. Eu amo vocês.

As minhas amigas irmãs que fiz durante a graduação, Emyli e Larissa. Passamos por muitos desafios e conquistas juntas durante esse período, sempre nos apoiando da maneira que podíamos, fossem nas conversas de horas, nos cafés para contar uma novidade ou outra do Departamento de Química, nos momentos estudando para

as disciplinas mais difíceis. Levo vocês no coração, como uma das coisas boas que a graduação e a UFSC me deram. Amo vocês meninas, obrigada por tanto!

Agradeço também aos amigos que fiz no laboratório Cromaas, onde passei ótimos três anos: Amanda, Fran, Lu, Nati, Ricardo, Diego, Natan e Diogo. Muitos ensinamentos foram passados durante nossas conversas sobre como resolver um problema de pressão no HPLC, ou qual a melhor técnica para ser usada com dada classe de compostos. Independente do assunto, memórias muito queridas foram criadas, obrigada pelos momentos sérios, pelos momentos de descontração, pelas festas juninas e confraternizações. A graduação foi mais leve porque vocês estavam presentes.

Gostaria de agradecer meu orientador, professor Eduardo Carasek, por todo o conhecimento passado durante esses anos de iniciação científica e TCC, e por ter dado a mim a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, confiando na minha capacidade de crescer e aprender naquele ambiente. Obrigada professor, foi um prazer inenarrável ser sua aluna!

Também, agradeço ao meu coorientador Dr. Lucas Morés, pela sua paciência em me ensinar sobre o mundo da cromatografia e do preparo de amostras e por fazê-lo de forma tão leve, além dos ensinamentos pessoais passados durante muitas conversas e cafés da tarde no laboratório. Muito obrigada pela amizade que criamos, és excelente como pessoa e como profissional.

Aos colegas da graduação que foram importantes para mim de alguma forma: Bruno, Manu, João Pedro, Gaby, Edu, Maira e a todos que contribuíram de alguma forma nessa jornada. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e divertida, obrigada de coração.

A todos os professores que conheci durante a graduação, pela dedicação e carinho que possuem em fazer o que fazem. Cada um me ensinou mais do que Química, me ensinou alguma lição valiosa sobre a vida também. Minha gratidão a esses profissionais essenciais para a formação de qualquer profissional.

A Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura e ensino. Pública, gratuita e de qualidade.

Ao PIBIC/CNPq, pelo fomento através de bolsa de iniciação científica, que permitiram o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A presença das sulfonamidas em amostras biológicas, provenientes do consumo incorreto e desenfreado, é objeto de estudos por representarem potenciais riscos à saúde humana. Diante disso, torna-se interessante o seu monitoramento visando o controle do uso e da exposição à população. Devido à sua ocorrência ser em níveis baixos e ao fato de que matrizes biológicas são consideradas complexas, torna-se necessária uma etapa primordial de preparo de amostras, neste contexto, a HF-MMLLE acoplada ao sistema de 96 poços de amostragem. Este preparo de amostras utilizado, viabiliza vantagens analíticas e ambientais, que enquadram a metodologia empregada nas diretrizes da Química Analítica Verde. O presente trabalho aborda o uso de solventes eutéticos profundos (DES) como alternativa de fase extratora na técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE), visando a extração de sulfonamidas em amostras de urina com posterior quantificação por HPLC-DAD. O estudo foi conduzido, mediante a seleção do DES, sendo que a mistura timol:ácido hexanóico (razão molar 2:1, m/v) apresentou a melhor resposta, aliado a maior estabilidade térmica. Depois, foram otimizados os parâmetros da HF-MMLLE, solvente de dessorção, tempo de dessorção, tempo de extração e pH. A metodologia otimizada foi realizada nas seguintes condições: 10 minutos de impregnação das membranas microporosas com 250 μL de timol:ácido hexanóico (2:1), em seguida 60 minutos de extração com 1,50 mL de amostra e 25 minutos de dessorção em 300 μL de uma mistura de ACN:MeOH (1:1 v/v). Foram construídas curvas de calibração para cada analito, a faixa linear avaliada varia de 10 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, com LOD e LOQ de 3,03 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os parâmetros avaliados acerca da confiabilidade da metodologia empregada, incluíram linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão, intradia e interdia, e exatidão, avaliada através das recuperações relativas. As recuperações foram realizadas em urina sintética, com todos os analitos dentro do intervalo aceitável estabelecido pela AOAC (2023). Os valores de coeficiente de determinação demonstram correlações lineares satisfatórias para todos os analitos. A aplicação em amostras reais foi realizada aliando-se ferramentas de análise de interferentes presentes no software do equipamento, podendo ser quantificado um dos compostos em uma amostra.

Palavras-chave: DES, HF-MMLLE, sulfonamidas, matrizes complexas, preparo de amostras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas das sulfonamidas avaliadas.....	18
Figura 2. Esquema das etapas do preparo de amostras via HF–MMLLE.....	22
Figura 3. Esquema representativo do comportamento do ponto de fusão em misturas eutéticas.....	23
Figura 4. Esquema da metodologia otimizada.....	31
Figura 5. Gráfico de barras da otimização do solvente de extração.....	35
Figura 6. Superfície de resposta da seleção do solvente de dessorção.....	36
Figura 7. Gráfico de barras da otimização do tempo de dessorção.....	37
Figura 8. Superfície de resposta do planejamento composto central.....	38
Figura 9. Gráficos de desejabilidade do planejamento composto central.....	39
Figura 10. Perfil dos picos dos analitos estudados.....	41
Figura 11. Cromatograma usado como branco da amostra A.....	42
Figura 12. Cromatograma usado como amostra teste da amostra A.....	42
Figura 13. Cromatograma resultante da subtração da amostra A.....	43
Figura 14. Cromatograma usado como branco da amostra B.....	43
Figura 15. Cromatograma usado como amostra teste da amostra B.....	44
Figura 16. Cromatograma resultante da subtração da amostra B.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas e propriedades físico-químicas a 25°C das sulfonamidas avaliadas.....	18
Tabela 2. Legislações que estabelecem limite máximo de resíduos para as sulfonamidas.....	19
Tabela 3. Programa de eluição por gradiente para análise das sulfonamidas.....	27
Tabela 4. Tempos de retenção das sulfonamidas estudadas.....	27
Tabela 5. Fração molar e aparência dos DES a serem avaliados.....	28
Tabela 6. Composição da urina sintética.....	29
Tabela 7. Planejamento multivariado utilizado na otimização do solvente de dessorção.....	30
Tabela 8. Planejamento multivariado utilizado na otimização da etapa de extração....	31
Tabela 9. Dados obtidos para os parâmetros de mérito.....	39
Tabela 10. Dados obtidos para precisão e exatidão do método.....	40
Tabela 11. Tabela comparativa de trabalhos publicados na literatura com o método proposto.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila (do inglês acetonitrile)
ADI	Doses Diárias Aceitáveis (do inglês <i>Aceptable Daily Intakes</i>)
ANOVA	Análise de Variância (do inglês <i>Analysis of Variance</i>)
AOAC	Associação Oficial dos Químicos Analíticos (do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
APVMA	Autoridade Australiana em Pesticidas e Medicamentos Veterinários (do inglês <i>Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority</i>)
C ₆	Ácido hexanóico
C ₇	Ácido heptanóico
C ₈	Ácido octanóico
C ₁₀	Ácido decanóico
DES	Solvente Eutético Profundo (do inglês <i>Deep Eutetic Solvent</i>)
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EU	União Europeia (do inglês <i>European Union</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês <i>Food and Drug Administration</i>)
H ₂ O-UP	Água ultrapura
HBA	Aceptor de Ligação de Hidrogênio (do inglês <i>Hydrogen Bond Acceptor</i>)
HBD	Doador de Ligação de Hidrogênio (do inglês <i>Hydrogen Bond Donor</i>)

HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibra oca (do inglês <i>hollow fiber liquid phase microextraction</i>)
HF-MMLLE	Microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (do inglês <i>hollow fiber microporous membrane liquid liquid extraction</i>)
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i>)
ICH	Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (do inglês <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
IN	Instrução Normativa
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOD	Limite de Detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i>)
LPME	Microextração em fase líquida (do inglês <i>Liquid Phase Microextraction</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MeOH	Metanol
RR	Recuperação Relativa
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>)
SDZ	Sulfadiazina
SMP	Sulfametóxi piridazina

SMTX	Sulfametoxazol
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>)
STZ	Sulfatiazol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1.	Sulfonamidas.....	17
2.1.1.	<i>Origem, Aplicações e Características Físico-químicas.....</i>	<i>17</i>
2.1.2.	<i>Implicações Biológicas e Ambientais.....</i>	<i>18</i>
2.2.	Preparo de Amostras.....	20
2.2.1.	<i>Extração Líquido-Líquido de Membrana Microporosa de Fibra Oca.....</i>	<i>21</i>
2.2.2.	<i>Solventes Eutéticos Profundos.....</i>	<i>23</i>
3.	OBJETIVOS.....	25
3.1.	Objetivo Geral.....	25
3.2.	Objetivos Específicos.....	25
4.	METODOLOGIA.....	26
4.1.	Reagentes e Materiais.....	26
4.2.	Instrumentação.....	26
4.3.	Preparo das Membranas.....	27
4.4.	Preparo e Seleção do Solvente de Extração.....	28
4.5.	Preparo da Urina Sintética.....	28
4.6.	Otimizações dos Parâmetros da HF-MMLLE.....	29
4.6.1.	<i>Seleção do Solvente de Dessorção.....</i>	<i>29</i>
4.6.2.	<i>Otimização da Etapa de Dessorção.....</i>	<i>30</i>
4.6.3.	<i>Otimização da Etapa de Extração.....</i>	<i>30</i>
4.7.	Resumo das Condições Otimizadas.....	31
4.8.	Parâmetros Analíticos de Mérito.....	32
4.9.	Aplicação da Metodologia.....	32
4.10.	Segurança no Laboratório e Tratamento de Resíduos.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1.	Seleção do Solvente de Extração: Preparo e Avaliação do Sinal Individual.....	34
5.2.	Otimização do Solvente de Dessorção.....	35
5.3.	Otimização do Tempo de Dessorção.....	36
5.4.	Otimização da Etapa de Extração.....	37
5.5.	Parâmetros Analíticos de Mérito.....	39
5.6.	Aplicação da Metodologia.....	41
5.7.	Comparação da Metodologia com Estudos Previamente Reportados.....	45
6.	CONCLUSÕES.....	47
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

APÊNDICE A – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS REALIZADOS PARA SELEÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO.....	56
APÊNDICE B – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS REALIZADOS PARA SELEÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO.....	57
APÊNDICE C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço da medicina moderna, cada vez mais substâncias vêm sendo produzidas e utilizadas no tratamento de doenças, e é fato que o uso exagerado e incorreto destas causam preocupação devido ao surgimento de organismos resistentes a estes medicamentos. As sulfonamidas são um exemplo onde o uso desenfreado pode acarretar o surgimento de bactérias multirresistentes. Além disso, o consumo sem orientação profissional desses antibióticos leva a efeitos adversos para a saúde humana, e tendo isto em vista, torna-se interessante o monitoramento de matrizes biológicas que podem conter estes compostos. Esse monitoramento tem relevância não apenas em estudos clínicos, mas também em contextos toxicológicos e ambientais, considerando que uma fração significativa das sulfonamidas é excretada de forma inalterada na urina, podendo chegar ao meio ambiente e contribuir para a disseminação da resistência bacteriana.

Matrizes biológicas como a urina são consideradas complexas e inadequadas para a análise direta nos instrumentos analíticos pois necessitam de uma etapa primordial de preparo de amostras, para eliminação de possíveis interferentes, pré-concentração dos compostos e adequação ao instrumento. Diversos trabalhos apontam que proteínas, sais e metabólitos endógenos presentes na urina podem comprometer a seletividade e a sensibilidade da análise, o que reforça a necessidade de métodos de preparo mais seletivos e compatíveis com técnicas de separação modernas. Aliado aos princípios da Química Analítica Verde, tem-se destacado no meio científico metodologias que empregam o uso de técnicas de microextração, pois estas, quando comparadas a técnicas clássicas, apresentam vantagens pela quantidade consideravelmente reduzida de geração de resíduos, e o aumento da frequência analítica. A extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE), é uma destas técnicas, que pode, ainda, ser acoplada a um sistema de 96 poços de amostragem, visando a melhora da frequência analítica e a automatização do sistema. Esse acoplamento se mostra particularmente atrativo em análises de rotina e em estudos com elevado número de amostras, nos quais a rapidez e a reprodutibilidade dos resultados são fatores essenciais.

Uma possível abordagem que pode ser empregada na HF-MMLLE é o uso de solventes eutéticos profundos (DES) como fase extratora, pois podem ser adequados de tal forma a exibirem extração satisfatória dos compostos de interesse. Esses solventes vêm despertando grande interesse devido à sua baixa toxicidade, fácil preparo, baixo custo e elevada versatilidade química, que permite ajustar suas propriedades às características dos analitos alvo. Diante de tal, este trabalho tem como objetivo o emprego de DES na extração de quatro sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametóxipiridazina e sulfametoxazol) em amostras de urina humana utilizando a técnica de HF-MMLLE acoplada ao sistema de 96 poços de amostragem, com quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

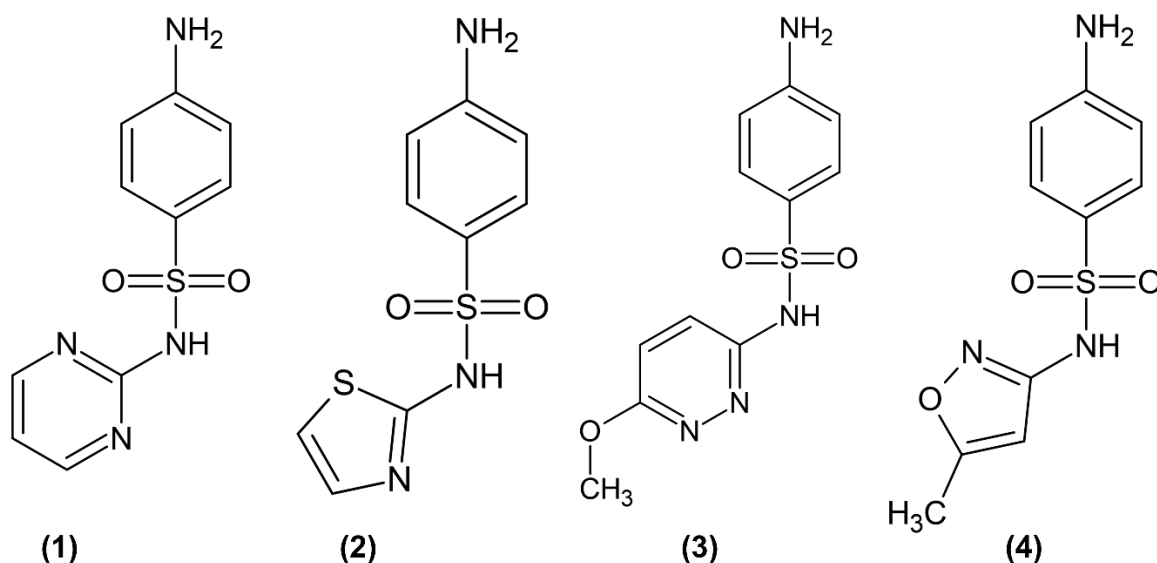
2.1. Sulfonamidas

2.1.1. *Origem, Aplicações e Características Físico-químicas*

As sulfonamidas, também conhecidas como sulfas, constituem uma classe de fármacos antimicrobianos sintéticos amplamente utilizada desde a década de 1930. Inicialmente foram introduzidas para o tratamento de infecções bacterianas em humanos, porém rapidamente se expandiram para a medicina veterinária e a produção animal, devido ao baixo custo e amplo espectro de ação^{1,2,3}. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva da enzima di-hidropteroato sintase, fundamental na síntese de ácido fólico das bactérias, levando à interrupção do crescimento bacteriano⁴.

Do ponto de vista físico-químico, as sulfas são compostos caracterizados pela presença do grupo funcional sulfonamida ($-\text{SO}_2\text{NH}_2$), ligado a um anel aromático e a uma amina primária em posição “para”. Tal configuração confere a essas moléculas estrutura relativamente rígida e polar, com regiões suscetíveis a interações hidrofóbicas (interações de van de Waals, dipolo-dipolo), hidrofílicas (ligações de hidrogênio) e interações π - π ^{1,3}. A substituição do hidrogênio da sulfonamida por grupos heterocíclicos ou aromáticos, tais quais piridinas ou tiazóis, modula significativamente as propriedades físico-químicas da molécula, alterando pKa, log Kow, solubilidade em água e perfil de ionização em diferentes pHs^{2,5}. Em geral, as sulfas apresentam caráter ácido fraco, com valores de pKa entre 5,7 e 7,2, característica que favorece ionização parcial em pH fisiológico e facilita a excreção renal^{3,5}. O valor de log de Kow, que trata sobre a lipofilicidade, também varia conforme a substituição, afetando a tendência à bioacumulação^{5,6,7}. Compostos com maior log Kow tendem a apresentar maior persistência ambiental, o que contribui para efeitos cumulativos em exposições repetidas ou contínuas^{2,8}. No presente trabalho, foram selecionadas quatro sulfonamidas representativas por serem frequentemente utilizadas na prática clínica e veterinária, além de estarem entre as mais detectadas em matrizes biológicas e ambientais^{6,7,9}. A Figura 1 traz as estruturas das quatro sulfas selecionadas para este estudo, e a Tabela 1 compila alguns dados relevantes sobre elas.

Figura 1. Estruturas químicas das sulfonamidas avaliadas, sendo (1): Sulfadiazina; (2): Sulfatiazol; (3): Sulfametóxipiridazina e (4): Sulfametoxazol.



Fonte: Autoria própria (2026).

Tabela 1. Estruturas e propriedades físico-químicas a 25°C das sulfonamidas avaliadas.

Analito	Peso molecular (g mol ⁻¹)	log Kow	pKa	Solubilidade (mg L ⁻¹) ^b
SDZ	250,28	-0,09	6,36	77,0
STZ	255,30	0,05	pKa1: 2,1 pKa2: 7,23 ^a	373,0
SMP	280,31	0,30	7,19	579,5
SMTX	253,28	0,89	pKa1: 1,6 pKa2: 5,7	-

Fonte: Autoria própria (2026). Dados: PubChem (2025). ^a à 20°C. ^b em água.

2.1.2. Implicações Biológicas e Ambientais

O uso indiscriminado destes compostos tem despertado crescente preocupação, tanto por seus efeitos adversos à saúde humana como pelos impactos ambientais relacionados ao descarte inadequado e à eliminação por excreção. A ingestão repetida ou em excesso, seja ela direta ou indiretamente, pode causar reações adversas, como distúrbios hematológicos, toxicidade hepática e

renal e hipersensibilidade^{3,7,9}. Ainda, mesmo em concentrações subterapêuticas (abaixo da dose mínima eficaz para tratamento), seus resíduos no meio ambiente contribuem significativamente para a disseminação da resistência antimicrobiana, e sua elevada persistência em meio aquoso e dificuldade de degradação completa por processos convencionais reforça sua presença como contaminantes emergentes^{2,5,8,9}. No que tange à riscos, diversos órgãos responsáveis passaram a regulamentar o uso das sulfas e estabelecer limites máximos de resíduos (LMRs) em alimentos e produtos de origem animal. A Tabela 2 traz um resumo de algumas legislações sobre o tema.

Tabela 2. Legislações que estabelecem limite máximo de resíduos para as sulfonamidas.

Instituição / documento	Ano	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Observação
Regulamento EU (EU 37/2010)	2010	100 (LMR total para sulfonamidas em tecidos animais)	Limite para carne, leite e ovos; aplicável ao grupo total das sulfas
APVMA – Acceptable Daily Intakes (ADI)	2025	50, peso corporal/ dia (ADI total para sulfas)	Limite diário aceitável considerando exposição contínua
MAPA – Ministério da Agricultura (Brasil, IN 42/1999)	1999	100 (LMR por substância, em carne, leite, ovos e mel)	Valor baseado em diretrizes internacionais e aplicado no controle de resíduos

Fonte: Autoria própria (2026). Dados: (MAPA, 1999)¹⁰; (APVMA, 2025)¹¹; (EU, 2010)¹².

Após administração, as sulfonamidas são absorvidas pelo trato gastrointestinal e amplamente distribuídas nos tecidos. Sofrem biotransformações hepáticas, como acetilação, e são eliminadas predominantemente pela urina^{4,15}. A excreção ocorre tanto na forma livre quanto na forma de metabólitos, sendo que cerca de 50 a 90% de uma dose pode ser recuperada na urina, dependendo do composto e das condições fisiológicos do indivíduo^{15,16}. Estudos farmacocinéticos demonstram que aproximadamente 84,5% da dose de sulfametoxazol é excretada pela urina em até 72 horas após ingestão, enquanto cerca de 66% da dose de sulfadiazina é

recuperada na forma inalterada. Além disso, concentrações urinárias de sulfadiazina entre 65 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram observadas nas primeiras 24 horas após administração oral^{13,14,15}.

Essa elevada excreção urinária torna a urina uma matriz-alvo fundamental para o biomonitoramento da exposição humana a estes compostos, além de representar um ponto crítico na avaliação ambiental, já que esses resíduos alcançam corpos d'água por esgoto doméstico e sistemas de saneamento^{5,17}. Estudos relatam a detecção de sulfonamidas na urina de pacientes expostos, bem como em experimentos controlados com animais^{15,17,18,19}. Diretrizes internacionais, como a *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*, da FDA, e a diretriz *ICH M10 – Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis*, desenvolvida pelo ICH, estabelecem recomendações para o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos destinados à quantificação de fármacos em matrizes biológicas, onde abordagens como HPLC-DAD e LC-MS são recomendadas^{20,21}. No entanto, a urina é uma matriz de caráter complexo, composta por sais, metabólitos endógenos, proteínas, ácidos orgânicos e outros constituintes que dificultam a análise direta por técnica instrumental, exigindo uma etapa prévia de preparo de amostras^{7,22,23}.

2.2. Preparo de Amostras

O preparo de amostras é uma etapa essencial no desenvolvimento de métodos analíticos, uma vez que influencia diretamente a confiabilidade dos resultados obtidos. A análise direta, embora desejável por sua simplicidade e economia de tempo, raramente é viável na prática, e isso se deve à presença de interferentes, à baixa concentração dos analitos e à natureza frequentemente incompatível das matrizes com os sistemas de detecção instrumental^{24,25,26}.

Nesse contexto, o preparo adequado da amostra é indispensável para melhorar a seletividade e a sensibilidade dos métodos, reduzir interferências e proteger os instrumentos analíticos. Técnicas amplamente difundidas, como a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE), são consideradas abordagens clássicas, reconhecidas em métodos oficiais. Apesar de serem técnicas que fazem a extração quase completa do analito das matrizes, havendo uma recuperação absoluta, conhecidas como abordagens exaustivas, tais métodos apresentam desvantagens importantes, como o uso de grandes volumes de solventes, elevados

custos, geração significativa de resíduos e maior complexidade operacional^{24,27}. Como resposta a essas limitações, a miniaturização das técnicas de preparo tem ganhado destaque por contribuir para procedimentos mais rápidos, econômicos e ambientalmente amigáveis, além de serem não-exaustivas, ou seja, não necessita extrair todo o analito da matriz, mas sim, trabalhar em um equilíbrio de partição. Essas abordagens estão em sintonia com os princípios da Química Analítica Verde, promovendo o uso reduzido de reagentes e amostras, e o aumento da frequência analítica^{26,28}. Estudos recentes também têm explorado a aplicação dessas abordagens miniaturizadas em diferentes matrizes, reforçando sua versatilidade e eficiência^{29,30,31}.

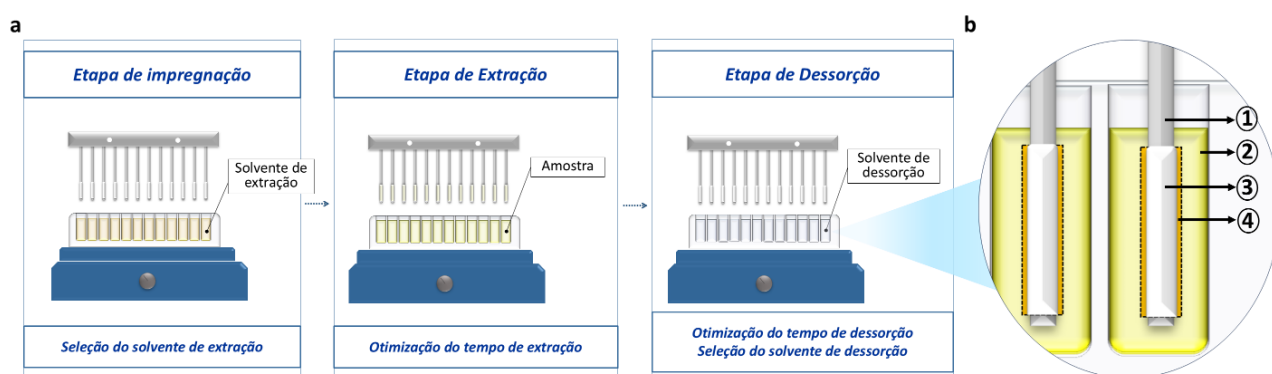
O advento da microextração em fase sólida (SPME), introduzido por Pawliszyn na década de 1990, inspirou e impulsionou o surgimento de novas técnicas, proporcionando a exploração de outras abordagens, incluindo diferentes configurações da microextração em fase líquida (LPME), por exemplo, a microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME), pioneira da extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE), que traz como proposta o uso do solvente extrator imobilizado nos poros da membrana hidrofóbica^{25,32,33}.

2.2.1. Extração Líquido-Líquido de Membrana Microporosa de Fibra Oca

Diversas estratégias de preparo de amostras têm sido desenvolvidas para a extração de sulfonamidas em urina, utilizando abordagens que aliam eficiência analítica e viabilidade ambiental. A extração líquido-líquido com membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) é uma técnica que combina os fundamentos da extração líquido-líquido (LLE) e da microextração com fibra oca (HF-LPME). Caracteriza-se por sua simplicidade e precisão, utilizando um solvente extrator retido exclusivamente nos poros da membrana. O lúmen desta membrana, que consiste no espaço interno, é preenchido por um suporte que não interage nem com o solvente orgânico, nem com a amostra, portanto, somente o solvente dos poros irá atuar na extração para que ocorra o equilíbrio. Entre suas principais vantagens estão o baixo consumo de solvente orgânico, o custo reduzido e a facilidade de operação³³.

A técnica de HF-MMLLE envolve três etapas principais (Figura 2). Primeiramente, ocorre a impregnação da membrana com o solvente extrator. Em seguida, ocorre a extração dos analitos da amostra, e por fim, a etapa de dessorção, na qual os analitos, juntamente com o solvente extrator, são removidos da membrana. Os parâmetros envolvidos nesse processo são cuidadosamente otimizados com o objetivo de aprimorar a eficiência da extração. Além disso, a técnica pode ser integrada a sistemas semi ou totalmente automatizados, como o sistema de 96 poços, o que representa um avanço significativo no aumento da frequência analítica, permitindo o preparo simultâneo de até 96 amostras^{27,28,34,35}.

Figura 2. Esquema das etapas do preparo de amostras via HF-MMLLE. Na Figura b, a configuração da técnica, sendo 1: Haste metálica; 2: Amostra; 3: Membrana oca e 4: Microporos da membrana.



Fonte: Autoria própria (2026).

Na HF-MMLLE, a otimização das condições experimentais é fundamental para garantir a eficiência da extração. Tempos muito curtos de extração ou dessorção podem resultar em extrações incompletas, enquanto tempos excessivos podem favorecer a retro-extração dos analitos, seja de volta para a amostra, durante a extração, ou para a membrana, durante a dessorção. Além disso, a escolha adequada do solvente extrator a ser impregnado nos poros da membrana é um fator determinante para o desempenho da técnica^{25,35}.

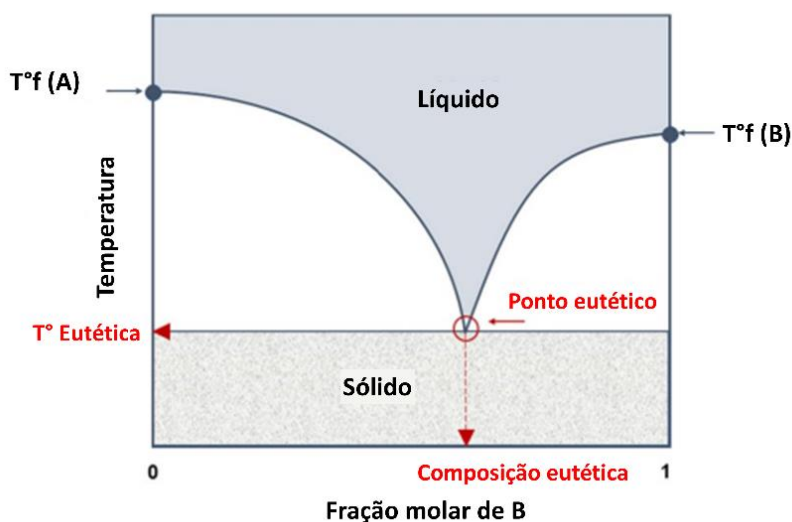
Técnicas como a HF-MMLLE oferecem diversas vantagens na extração de analitos presentes em matrizes complexas. No entanto, ainda é relativamente restrito o número de estudos que utilizam fases extratoras líquidas em associação com métodos de microextração. Estudos que exploram o uso de solventes eutéticos

profundos (DES) têm se destacado como alternativas na análise de matrizes biológicas como a urina, empregando técnicas de microextração^{31,36}.

2.2.2. Solventes Eutéticos Profundos

A busca por fases extratoras alternativas no preparo de amostras é contínua, variando conforme a técnica e o analito³⁷, e os solventes eutéticos profundos (DES) surgem como uma classe promissora de solventes verdes. Os DES são formados pela combinação de dois ou mais compostos, um doador de ligações de hidrogênio (HBD) e um aceptor de ligações de hidrogênio (HBA), que interagem fortemente por meio dessas ligações. Quando misturados em proporções adequadas, esses componentes geram uma redução expressiva no ponto de fusão da mistura em comparação com os compostos puros isolados, fenômeno característico de sistemas eutéticos. Um exemplo clássico é a combinação de ureia (HBD) com cloreto de colina (HBA), cujos pontos de fusão superiores a 100°C e 302°C, respectivamente, resultam em uma mistura líquida a temperatura ambiente, com ponto de fusão em torno de 12°C³⁸. A atenção para esses solventes alternativos se intensificou após um estudo de Abbott *et al.*, que descreveu esse comportamento em diferentes combinações HBA-HBD^{39,40}.

Figura 3. Esquema representativo do comportamento do ponto de fusão em misturas eutéticas.



Fonte: Adaptado de El Achkar et al. (2021)⁴¹.

Dada a vasta gama de combinações possíveis entre HBD e HBA, os DES têm sido amplamente estudados na análise de contaminantes emergentes, como as sulfonamidas³¹. Embora a necessidade de ajustar a aplicabilidade possa ser um desafio devido à variedade de combinações binárias, essa mesma característica é uma das principais vantagens dos DES, pois permite a criação de materiais com características únicas de interação e seletividade³⁹.

Esses solventes se destacam por sua alta estabilidade térmica, baixa volatilidade e polaridade ajustável, o que os torna excelentes substitutos para compostos orgânicos voláteis comumente empregados (clorofórmio, octanol, diclorometano). Além disso, eles são geralmente mais baratos, biodegradáveis, não tóxicos e fáceis de preparar. Embora se saiba que suas estruturas são mantidas por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, ainda há incertezas sobre como os componentes individuais interagem entre si, com outros compostos presentes na matriz e a resolução final de suas estruturas. No entanto, suas propriedades físico-químicas permitem que analitos como as sulfonamidas sejam facilmente extraídas por meio da HF-MMLLE, devido às características em comum com a membrana e com o DES usado como solvente extrator imobilizado nos poros da membrana. Isso faz da HF-MMLLE uma opção atraente para a extração e pré-concentração desses analitos^{39,42}.

O presente trabalho, portanto, tem por objetivo o uso de DES como fase extratora na técnica de HF-MMLLE, ampliando sua aplicabilidade na extração de sulfonamidas em matrizes de caráter complexo, como a urina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo o uso de DES na extração de quatro sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametóxipiridazina e sulfametoxazol) em amostras de urina utilizando a técnica de HF-MMLLE acoplada ao sistema de 96 poços de amostragem, com quantificação por HPLC-DAD.

3.2. Objetivos Específicos

- Preparar e avaliar a eficiência de extração de diferentes solventes eutéticos profundos, para seleção daquele que apresenta o melhor desempenho na extração de sulfonamidas em urina, pela técnica de HF-MMLLE;
- Realizar a otimização dos parâmetros da HF-MMLLE relacionados às etapas de extração (tempo e pH) e dessorção (tempo, solvente e volume de solvente);
- Determinar e avaliar os parâmetros analíticos de mérito, tais quais limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), faixa linear de trabalho, precisão e exatidão, além do coeficiente de determinação (R^2);
- Aplicar a metodologia otimizada e validada a diferentes amostras de urina humana para confirmação da seletividade e reprodutibilidade do método desenvolvido.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e Reagentes

Os padrões sólidos de cada analito foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) e, a partir destes, soluções estoque individuais foram preparadas com concentrações de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, usando metanol como solvente. Destas soluções, foi preparado um mix de 50 mg L^{-1} contendo as quatro sulfas em metanol, que serviu como solução estoque para realização do trabalho. Foram utilizados os solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e acetato de etila (AcEt) fornecidos pela Merck (Rio de Janeiro, BR), J. T. Baker (Center Valley, USA) e Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), respectivamente. A água ultrapura foi obtida com uma resistividade de $18,3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, através do sistema de purificação Mega Purity (Billerica, MA, USA).

Para o preparo da urina sintética, padrões analíticos dos seguintes sais foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , KCl, NH_4Cl e ureia.

Para o preparo dos DES, foram utilizados timol, ácido hexanóico, ácido heptanóico, ácido octanóico e ácido decanóico, obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A membrana microporosa oca de polipropileno PP300/1200 Accurel® com 1,2 mm, 300 μm e 0,2 μm de diâmetro interno, espessura e tamanho de poro, respectivamente, foi obtida da Membrane (Wuppertal, Germany). As amostras de urina foram obtidas de indivíduos saudáveis, estando de acordo com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (nº. 11300913718.3.0000.0121).

4.2. Instrumentação

Para a realização deste trabalho foi utilizado um sistema semiautomático de 96 poços de amostragem, da Brüder Mannesmann Werkzeuge (Remscheid, Alemanha), para a etapa de preparo de amostras. Já para a etapa de detecção e quantificação, foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A e com injetor automático modelo SIL-20AC, com volume de injeção de 20 μL .

A separação cromatográfica, baseada no trabalho de Vieira et al²⁹., deu-se em fase reversa, utilizando uma coluna Kinetex Phenomenex® C18 (5,0 µm x 250 mm x 4,6 mm). Para fase móvel, foi usada eluição por gradiente, com vazão de 1,0 mL min⁻¹, com os solventes H₂O-UP:MeOH, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, e eluição descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de eluição por gradiente para análise das sulfonamidas.

Tempo (min)	% H ₂ O-UP (0,1% ácido fórmico)	% MeOH (0,1% ácido fórmico)
0,01	80	20
3,00	80	20
5,00	50	50
7,00	30	70
10,00	30	70
12,00	80	20
20,00	80	20

Fonte: Autoria própria (2026).

Para os quatro analitos, foi selecionado o mesmo comprimento de onda para monitoramento (máximo de absorção no UV-Vis), sendo este 270 nm⁴³. Também, a Tabela 4 traz os tempos de retenção dos compostos estudados.

Tabela 4. Tempos de retenção das sulfonamidas estudadas.

Analito	Tempo (min)
Sulfadiazina	5,2
Sulfatiazol	5,8
Sulfametóxi piridazina	9,9
Sulfametoxazol	10,5

Fonte: Autoria própria (2026).

4.3. Preparo das Membranas

Para o preparo das membranas, adaptou-se metodologias descritas na literatura^{34,44}. As membranas foram cortadas em 1,5 cm de comprimento, limpas com ACN e secas em temperatura de 80°C. Por seguinte, estas foram encaixadas nas hastes do sistema de 96 poços de amostragem, de modo que o interior da membrana não ficasse exposto, e então, submersas em 250 µL de DES e mantidas

sob agitação por 10 minutos, para que houvesse a formação da membrana líquida suportada.

4.4. Preparo e Seleção do Solvente de Extração

Pela combinação do mesmo HBD com diferentes HBAs, em determinadas razões molares, foram preparadas dezesseis combinações, descritas na Tabela 5. O timol foi selecionado como HBD por apresentar características que favoreçam interações apolares (interações de Van der Waals, dipolo-dipolo), polares (ligações de hidrogênio) e π - π com os anéis aromáticos das sulfas, tornando-se um componente estratégico para a eficiência da extração. Para a seleção do HBA, foi realizado planejamento univariado. Ainda, para obtenção de informações acerca de uma possível interferência do sinal do DES com o sinal dos analitos, obteve-se um branco de cada DES em HPLC-DAD. Após, os DES foram testados em água ultrapura fortificada em $500 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo 10 minutos de impregnação, 60 minutos de extração e 20 minutos de dessorção numa mistura de ACN:MeOH (1:1, v/v). O DES que apresentou melhor eficiência de extração, baseada nas áreas, nos RSDs e em análise por ANOVA e Tukey, foi selecionado como solvente de extração.

Tabela 5. Fração molar e aparência dos DES a serem avaliados.

DES	HBD:HBA	Aparência (temperatura ambiente)
Timol:C ₆ , C ₇ , C ₈ , C ₁₀	1:1	Líquido amarelo
Timol:C ₆ , C ₇ , C ₈ , C ₁₀	2:1	Líquido amarelo
Timol:C ₆ ^a , C ₇ ^b , C ₈ ^b , C ₁₀ ^b	3:1	^a Líquido amarelo, ^b Sólido branco
Timol:C ₆ , C ₇ , C ₈ , C ₁₀	3:2	Líquido translucido

Fonte: Autoria própria (2026).

4.5. Preparo da urina sintética

A urina sintética foi preparada baseada em metodologia descrita na literatura⁴⁵. A Tabela 6 descreve os compostos usados e suas respectivas quantidades, em um volume final de 250 mL de água ultrapura.

Tabela 6. Composição da urina sintética.

Composto	Massa (g)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,28
NaCl	0,73
Na ₂ SO ₄	0,56
KH ₂ PO ₄	0,35
KCl	0,40
NH ₄ Cl	0,25
Ureia	6,25

Fonte: Autoria própria (2026). Dados: (Baccarin; Cervini; Cavalheiro, 2018)⁴⁵.

4.6. Otimização dos Parâmetros da HF-MMLLE

A avaliação dos parâmetros que influenciam as etapas da HF-MMLLE, foi realizada por métodos uni e multivariados. No caso dos planejamentos multivariados, as respostas foram avaliadas pelo software Statsoft Statistica®, no qual foram utilizadas as médias geométricas das áreas dos picos de cada sulfa avaliada. Ademais, Microsoft Excel® e OriginPro® também foram utilizados nas demais análises. Os parâmetros que influenciam as etapas da HF-MMLLE avaliados foram o tempo de extração, solvente de dessorção e tempo de dessorção, sendo que dentro da etapa de extração, foi avaliado também o efeito de pH, tendo em vista os valores de pKa das sulfas. O efeito *salting-out* não foi avaliado pois a urina por si só já contém sais em sua composição.

4.6.1. Seleção do Solvente de Dessorção

Para seleção do solvente de dessorção, foi avaliada a eficácia na dessorção dos solventes ACN, MeOH e AcEt, tanto em sua forma pura quanto em misturas, com uma triplicata do ponto central, empregando um planejamento multivariado *simplex-centróide*, pelo software Statsoft Statistica®, descrito na Tabela 7. Os experimentos foram conduzidos em urina sintética fortificada em 500 µg L⁻¹, sendo 10 minutos de impregnação, 60 minutos de extração e 20 minutos de dessorção numa mistura de ACN:MeOH (1:1, v/v). Ainda, foi avaliado o perfil cromatográfico da urina sintética, submetendo-a às mesmas etapas, porém sem fortificação, para

avaliação de possíveis interferentes. A seleção do solvente deu-se pelo Statsoft Statística®, através da obtenção de uma superfície de resposta.

Tabela 7. Planejamento multivariado utilizado na otimização do solvente de dessorção.

Experimento	ACN (μL)	MeOH (μL)	AcEt (μL)
1	300	0	0
2	0	300	0
3	0	0	300
4	150	150	0
5	150	0	150
6	0	150	150
7A, 7B, 7C	100	100	100
8	200	50	50
9	50	200	50
10	50	50	200

Fonte: Autoria própria (2026).

4.6.2. Otimização da Etapa de Dessorção

A avaliação do tempo de dessorção foi realizada por planejamento univariado, em triplicata. O experimento foi feito utilizando urina sintética fortificada em 500 μg L⁻¹, sendo submetida a tempos de dessorção de 10, 15, 20 e 25 minutos com o solvente de dessorção otimizado. Os resultados foram avaliados por resposta de área e RSD, assim como por ANOVA e Tukey.

4.6.3. Otimização da Etapa de Extração

Nesta etapa, foi avaliado concomitantemente tempo de extração e pH através de um planejamento multivariado *composto central*, pelo software Statsoft Statística®, descrito na Tabela 8. Os experimentos foram realizados em urina sintética fortificada em 500 μg L⁻¹, e a etapa subsequente de dessorção foi realizada com os demais parâmetros já otimizados. A seleção do tempo de extração e pH deu-se pelo Statsoft Statística®, através da obtenção de uma superfície de resposta e através da avaliação de parâmetros de desejabilidade do planejamento proposto.

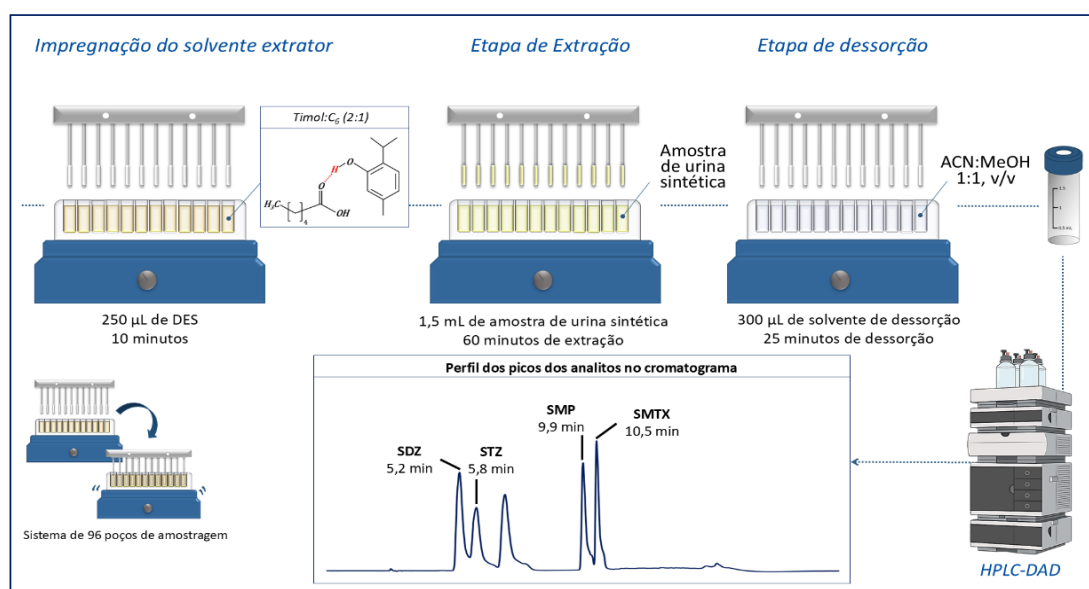
Tabela 8. Planejamento multivariado utilizado na otimização da etapa de extração.

Experimento	Tempo de extração (min)	pH
1	30,00	3,00
2	30,00	7,00
3	60,00	3,00
4	60,00	7,00
5	23,78	5,00
6	66,21	5,00
7	45,00	2,17
8	45,00	7,83
9 (C)	45,00	5,00
10 (C)	45,00	5,00

Fonte: Autoria própria (2026).

4.7. Resumo das Condições Otimizadas

A membrana de polipropileno foi cortada em partes de 1,5 cm de comprimento e impregnadas em 250 μ L de DES composto de timol: C_6 (2:1, fração molar) por 10 minutos. Em seguida, a membrana impregnada foi imersa em 1,5 mL de amostra de urina sintética pH 5 por 60 minutos para a extração dos analitos. Após, a membrana foi imersa em 300 μ L de solvente de dessorção, uma mistura composta por acetonitrila:metanol (1:1, v/v), por 25 minutos.

Figura 4. Esquema da metodologia otimizada.

Fonte: Autoria própria (2026).

4.8. Parâmetros Analíticos de Mérito

Foram construídas curvas de calibração para cada analito com oito pontos, realizadas em triplicata para cada ponto, utilizando urina sintética. A partir destas curvas foram obtidos parâmetros analíticos de mérito como limite de quantificação (LOQ), definido como o primeiro ponto da curva de calibração em que se obteve resposta com precisão adequada ($RSD \leq 20\%$) e limite de detecção (LOD), definido como LOQ dividido por 3,3⁴⁶. Também foi obtida faixa linear de trabalho e coeficiente de determinação (R^2), bem como exatidão, precisão e linearidade do método.

A precisão foi avaliada sob duas abordagens, intradia e interdia. Na intradia, os valores de RSD foram avaliados em triplicatas no mesmo dia ($n=3$). Já para a precisão interdia, o mesmo método é aplicado em três dias consecutivos ($n=9$). Ambas foram comparadas nas concentrações de 25, 50, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, (pontos mínimos, médios e máximos das curvas, respectivamente).

A exatidão do método foi verificada conforme diretrizes da AOAC, por meio de ensaios de recuperação, definidos como um percentual da razão entre o resultado médio de recuperação dos analitos e o valor real da concentração dos analitos adicionados a amostra. Esta avaliação foi realizada em uma amostra de urina sintética fortificada em quatro níveis de concentração, presentes na faixa linear de trabalho, sendo estes: 25, 50, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.9. Aplicação da Metodologia

A metodologia otimizada e validada foi aplicada em duas amostras de urina sendo que um dos indivíduos não estava fazendo uso de sulfas, e o outro estava fazendo uso de sulfametoxazol. As amostras avaliadas são descritas neste estudo como amostras A e B.

4.10. Segurança no Laboratório e Resíduos Gerados

Foram adotadas medidas de segurança, tais como o uso de EPIs, como jaleco, sapatos fechados e principalmente luvas. Os resíduos gerados durante a preparação das amostras e análise por HPLC, foram armazenados em contentores

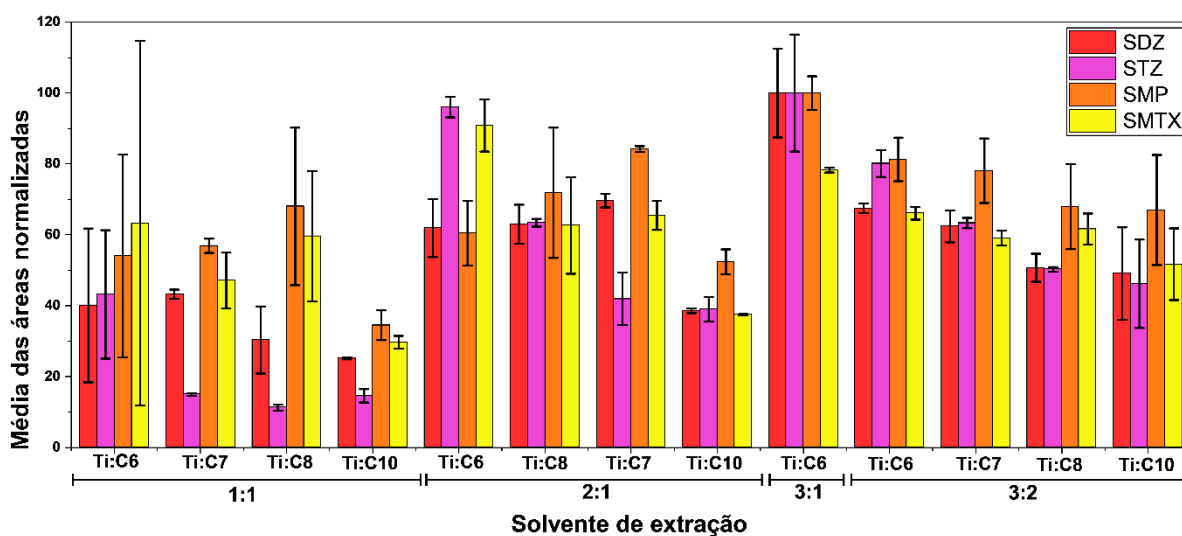
apropriados e posteriormente encaminhados a empresa responsável pelo tratamento de resíduos da Universidade Federal de Santa Catarina. Tais medidas são essenciais para garantir a integridade do ambiente de trabalho, não apenas aos envolvidos na pesquisa, mas também aos membros do laboratório em geral.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção do Solvente de Extração: Preparo e Avaliação do Sinal Individual

Conforme descrito anteriormente, foram preparadas as dezesseis combinações de DES selecionadas, sendo que as proporções 1:1 e 2:1 formaram a mistura eutética sem necessidade de agitação ou aquecimento, enquanto as proporções 3:1 e 3:2 necessitaram de ambos, sendo assim submetidas aos dois processos para formação da mistura eutética. Os DES timol:C₇, timol:C₈ e timol:C₁₀, na proporção 3:1, apesar de formarem a mistura, rapidamente retornam ao estado inicial sólido, e por tal, não seguiram para a etapa de avaliação dos sinais e teste de extração.

Na avaliação dos sinais individuais, constatou-se que nenhuma das treze combinações apresentaram interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos estudados, logo estes mesmos foram submetidos a testes de extração, realizados em duplicata, em urina sintética fortificada em 500 µg L⁻¹, com 60 minutos de extração e 20 minutos de dessorção. A partir das áreas normalizadas dos picos cromatográficos, foi elaborado o gráfico apresentado na Figura 4, no qual observou-se o destaque do timol:C₆ 3:1 e 2:1. A partir destes dados, foram realizados os testes ANOVA e Tukey, que comprovaram diferença estatística significativa entre os DES avaliados, como também se comprovou que a mistura timol:C₆ na proporção 3:1 difere dos demais. Porém, esta proporção em específico solidifica com o tempo em repouso, então pensando na continuidade do trabalho, avaliando o nível de significância, as áreas normalizadas e os RSDs de cada um, o DES timol:C₆ na proporção 2:1 foi selecionado como solvente de extração.

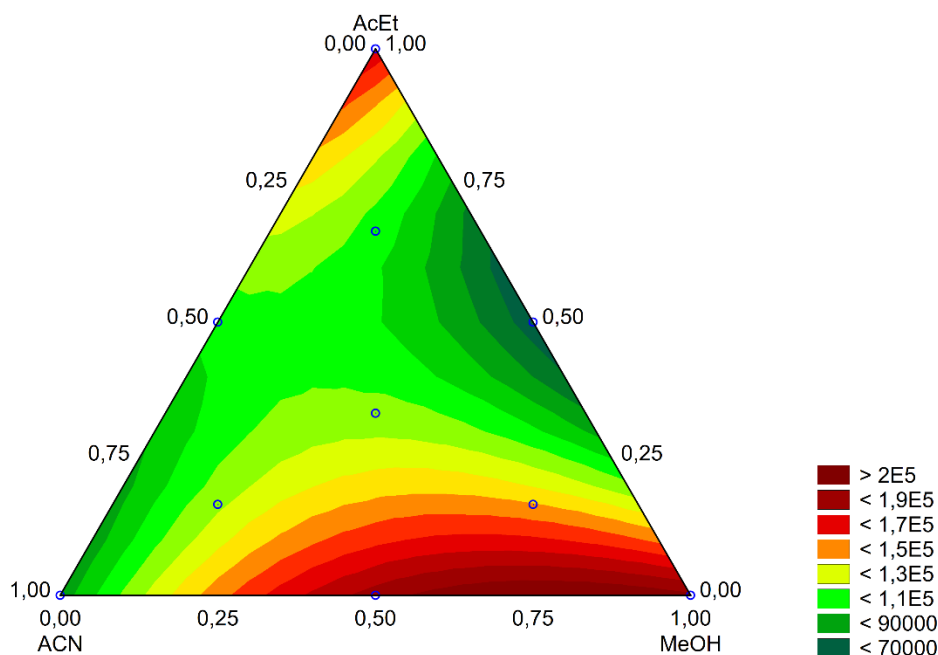
Figura 5. Gráfico de barras da otimização do solvente de extração.

Fonte: Autoria própria (2026).

5.2. Otimização do Solvente de Dessorção

Para seleção do solvente de dessorção, foram realizados os experimentos do planejamento multivariado. No preparo dessas amostras, utilizou-se o timol:C₆ (2:1), previamente selecionado, uma amostra de urina sintética fortificada em 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 60 minutos de extração e 20 minutos de dessorção. A partir das médias geométricas das respostas dos analitos, foi gerada a superfície de resposta (Figura 6), com R^2 de 0,7435, a partir de um modelo matemático construído pelo cúbico especial, demonstrando uma relação satisfatória dos resultados, indicando que na região de mistura de acetonitrila e metanol, que compreende de 50% de ambos até 100% de metanol, tem-se as melhores respostas. Entretanto, ao se avaliar os cromatogramas obtidos com 100% de metanol, alguns picos não apresentavam resolução adequada quando se comparado a adição de uma proporção de ACN a mistura deste solvente. Assim, para garantir áreas com precisão e exatidão, foi selecionada uma mistura de ACN:MeOH (1:1, v/v), que está em uma condição ótima pela superfície de resposta gerada.

Figura 6. Superfície de resposta da seleção do solvente de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2026).

5.3. Otimização do Tempo de Dessorção

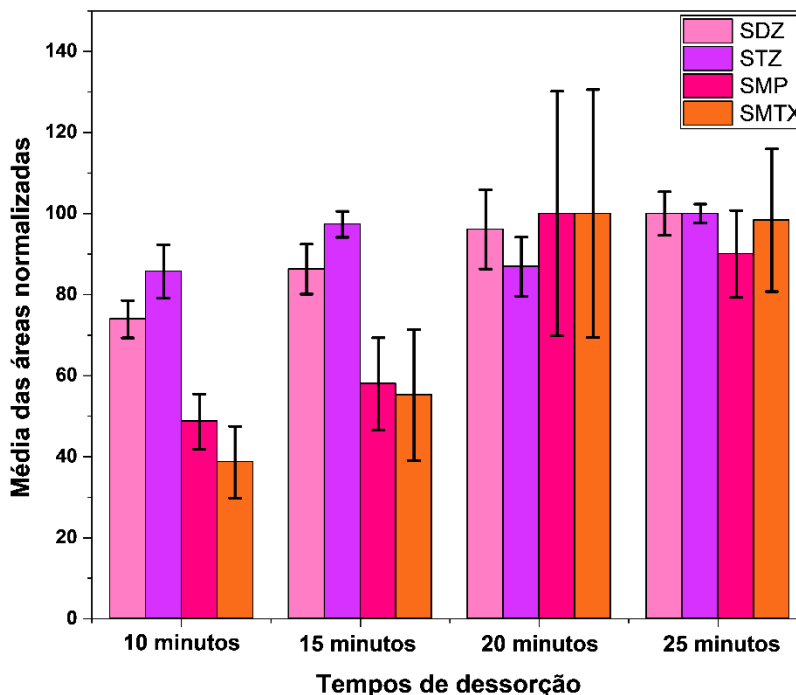
A escolha de um tempo de dessorção adequado é fundamental para a eficiência desta etapa. Intervalos demasiadamente curtos podem comprometer a completa dessorção dos analitos extraídos, enquanto tempos excessivamente longos podem afetar o retorno da mistura (solvente-DES-analitos) para os poros da membrana oca não preenchidos. Assim, torna-se essencial estabelecer um equilíbrio que assegure resultados representativos da concentração dos analitos na amostra.

Para otimização do tempo de dessorção, procedeu-se a análise em triplicata, de uma amostra de urina sintética fortificada em $500 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando tempos de dessorção de 10, 15, 20 e 25 minutos. Nesse contexto, além do gráfico de barras (Figura 7), foi realizada a ANOVA, que indicou diferença significativa entre os tempos avaliados. Com base nisso, foi feito também o teste de Tukey, que mostrou que os maiores tempos não diferem significativamente entre si, o menor tempo apresentou resultado significativamente inferior, enquanto o tempo de 15 minutos não diferiu dos demais.

Embora os dois maiores tempos tenham apresentado desempenho semelhante, observou-se que um deles apresentou maior variabilidade entre as

repetições. Assim, a escolha recaiu sobre o tempo de 25 minutos, que, além de estar no grupo de melhor desempenho, apresentou maior precisão e consistência nos resultados.

Figura 7. Gráfico de barras da otimização do tempo de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2026).

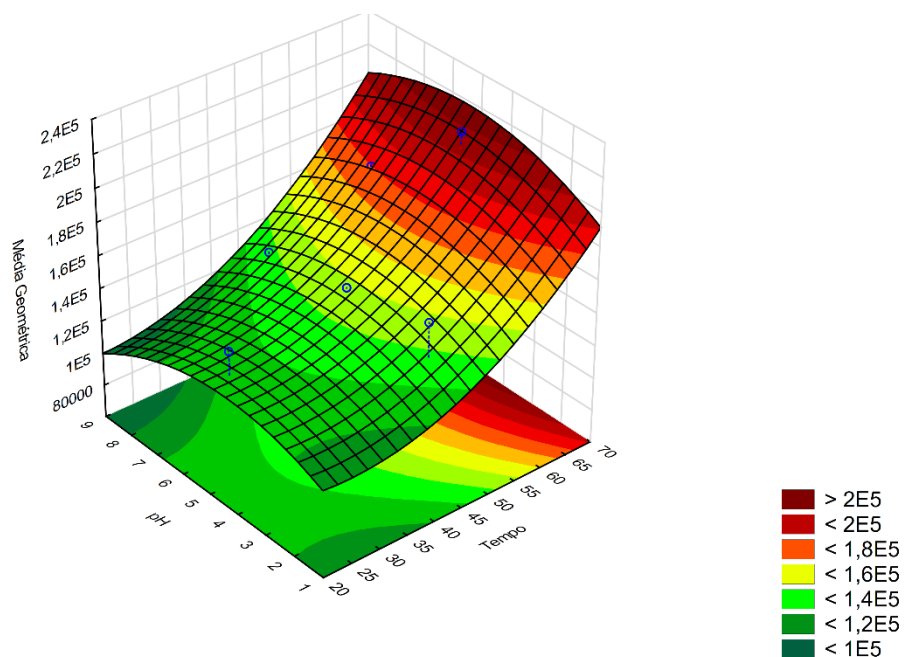
5.4. Otimização da Etapa de Extração

A última etapa interferente na HF-MMLLE a ser otimizada, foi a etapa de extração. Dentro desta etapa, foram avaliados os parâmetros tempo e pH. De maneira similar à etapa de dessorção, a condição ótima de tempo de extração deve ter duração suficiente para promover a extração dos compostos de interesse presentes na amostra, evitando, entretanto, a migração dos analitos já extraídos de volta para a amostra.

Para seleção do tempo e pH, foram realizados os experimentos do planejamento multivariado. No preparo dessas amostras, utilizou-se o timol:C₆ (2:1), previamente selecionado, uma amostra de urina sintética fortificada em 500 µg L⁻¹, 60 minutos de extração e 25 minutos de dessorção. A partir dos dados obtidos, gerou-se a superfície de resposta (Figura 8) com R² de 0,8266, a partir de um modelo linear quadrático com efeito de duas variáveis, indicando uma região

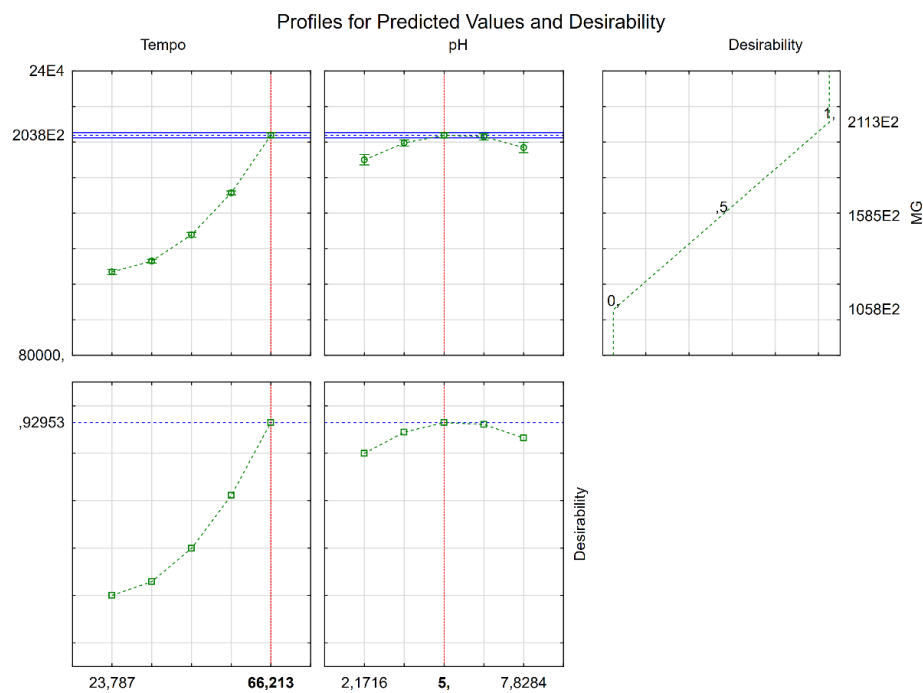
ótima de pH 5 e tempo de extração acima de 60 minutos. Apesar disso, o formato da superfície sugere tempos ainda maiores como ótimos, fazendo com que o gráfico não apresente o formato clássico esperado – uma superfície com concavidade bem ao centro do gráfico – o que mostra que nem sempre há concordância entre o ajuste matemático e os dados experimentais. Por isso, a função de desejabilidade do método (Figura 9) foi utilizada para corroborar a escolha das condições ótimas, já que integra as respostas em um único índice de otimização. A partir dessa análise, observou-se que o pH 5 apresentou a maior desejabilidade, sendo escolhido como condição ideal. No caso do tempo, o valor estimado foi de 66 minutos; contudo, considerando a frequência analítica e a necessidade de praticidade, optou-se por arredondar para 60 minutos. Dito isso, pH 5 e tempo de extração de 60 minutos foram selecionados como condições ótimas.

Figura 8. Superfície de resposta do planejamento composto central.



Fonte: Autoria própria (2026).

Figura 9. Gráficos de desejabilidade do planejamento composto central.



Fonte: Autoria própria (2026).

5.5. Parâmetros Analíticos de Mérito

Utilizando as condições otimizadas em urina sintética, foram obtidas curvas de calibração para cada analito. Os parâmetros obtidos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Dados obtidos para os parâmetros de mérito.

Parâmetros	Analitos			
	SDZ	STZ	SMP	SMTX
Equação da reta	$y = 14,28x - 392,52$	$y = 10,869x + 221,91$	$y = 210,95x - 852,08$	$y = 178,49x - 317,8$
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25,0	50,0	10,0	10,0
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7,57	15,15	3,03	3,03
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25 – 500	50 – 500	10 – 500	10 – 500
R ²	0,9987	0,9986	0,9979	0,9977

Fonte: Autoria própria (2026).

As faixas lineares de trabalho variaram de 10 – 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, com R² superiores a 0,9977 e valores de LOD e LOQ de 7,57 e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para sulfadiazina, 15,15 e

50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o sulfatiazol, e 3,03 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para sulfametóxi piridazina e sulfametoxazol, respectivamente para cada analito.

A Tabela 10 exibe os resultados da avaliação da precisão do método proposto. A precisão intradia variou de 0,58 a 12,28%, enquanto a interdia variou de 6,16 a 15,01%. A tabela apresenta ainda a exatidão do método, avaliada pela porcentagem de recuperação relativa (%RR), que apresentou valores que variaram de 67,55% a 107,17%. Os valores obtidos tanto para precisão, quanto para exatidão, são considerados satisfatórios, uma vez que estão de acordo com as diretrizes da AOAC⁴⁷ que determina que o RSD na precisão deve ser menor que 20%, e que a %RR encontre-se entre 60 e 115% para concentrações entre 10 e 99 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 80 e 110% para concentrações entre 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a sulfadiazina, na concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, o valor de %RR ficou muito próximo do limite inferior (67,55%), e isso porque esta possui o menor valor de log Kow entre os quatro analitos, preferindo permanecer em meio hidrofílico.

Tabela 10. Dados obtidos para precisão e exatidão do método.

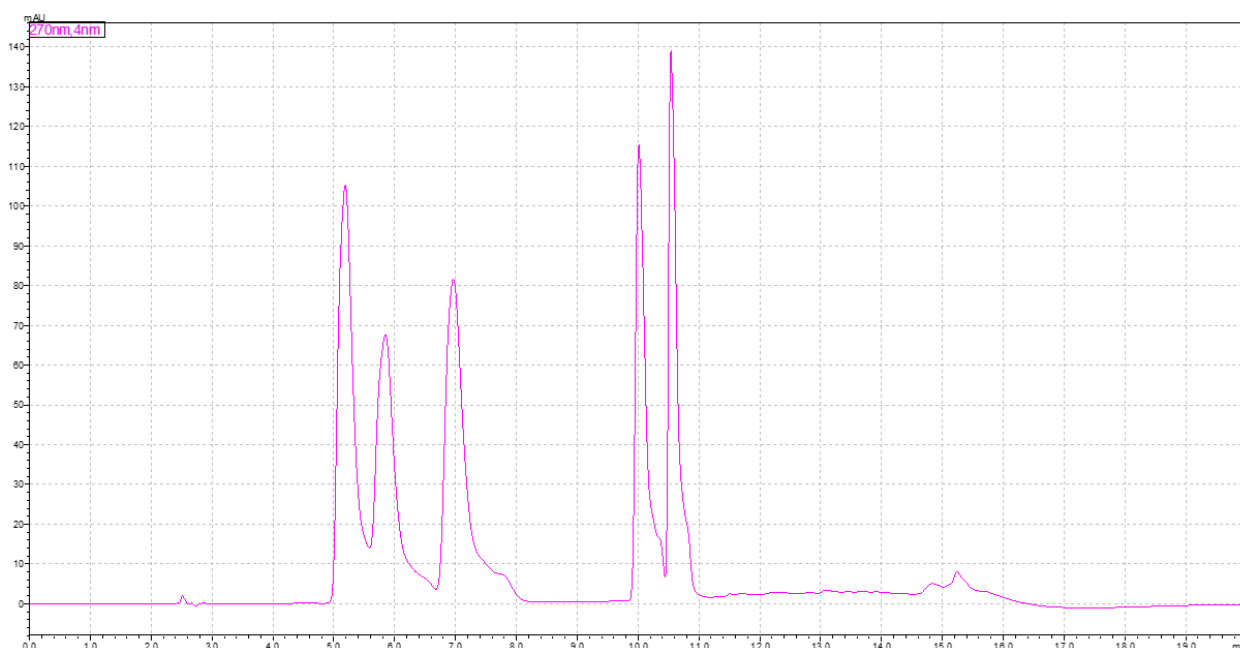
Analitos	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão expressa pelo RSD		Exatidão expressa pela %RR
		Intradia (%) (n=3)	Interdia (%) (n=9)	Urina sintética
Sulfadiazina	25	5,14	15,01	67,55
	300	0,58	11,35	104,27
	500	10,13	7,33	101,40
Sulfatiazol	50	12,28	11,75	97,72
	300	10,64	10,73	102,14
	500	1,88	7,11	107,17
Sulfametóxi piridazina	25	1,19	12,18	98,20
	300	7,85	12,08	96,24
	500	4,55	6,98	94,54
Sulfametoxazol	25	4,42	10,57	92,97
	300	8,20	12,59	100,38
	500	5,30	6,16	103,82

Fonte: Autoria própria (2026).

5.6. Aplicação da Metodologia

A separação das sulfas deu-se conforme a Figura 10, onde apresentam-se os tempos 5,2 minutos para a sulfadiazina, 5,8 para o sulfatiazol, 9,9 para a sulfametóxi piridazina e 10,5 minutos para o sulfametoxazol. O perfil da separação foi exposto aqui para comparação com os tempos de retenção dos analitos nas amostras estudadas, quando presentes.

Figura 10. Perfil dos picos dos analitos estudados.



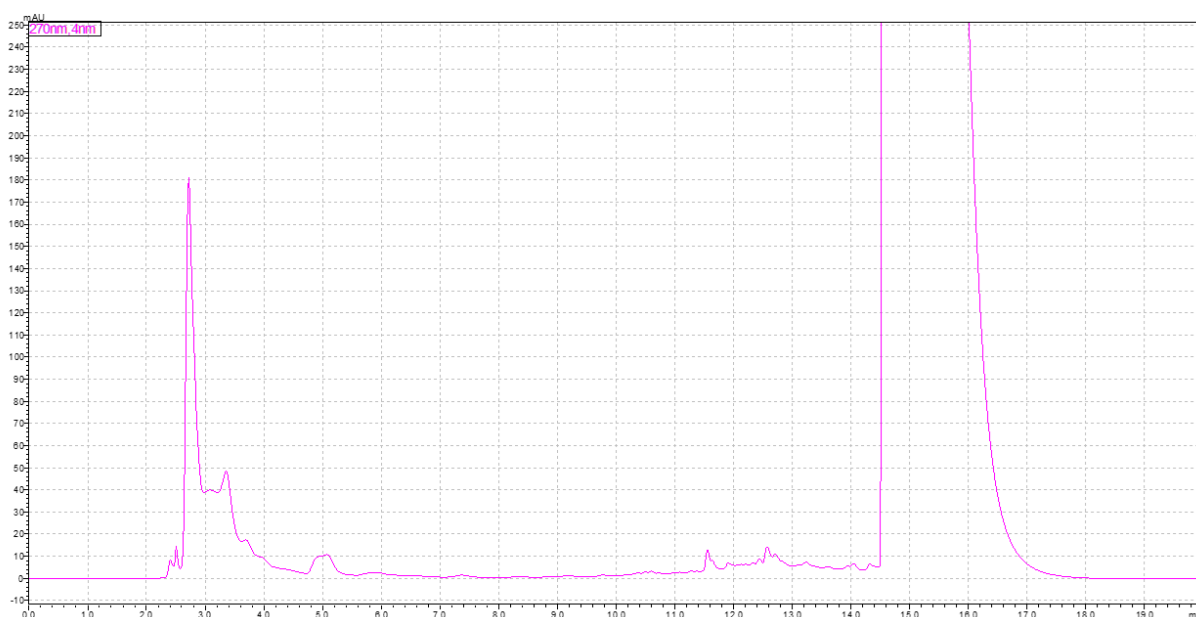
Fonte: Autoria própria (2026).

Para avaliação da aplicabilidade da metodologia proposta, foram analisadas duas amostras reais de urina provenientes de indivíduos distintos, sendo uma de um indivíduo que não fazia uso de sulfonamidas e outra de um indivíduo em tratamento com sulfametoxazol. Considerando a elevada complexidade da matriz urina, caracterizada pela presença de diversos compostos endógenos e exógenos que podem atuar como interferentes na detecção dos analitos, cada amostra foi analisada em duplicata, sendo uma replicata considerada como branco da matriz e a outra como amostra teste⁴⁸.

Através da ferramenta de subtração presente no software *LCSolution* da Shimadzu, os perfis cromatográficos obtidos demonstram a eliminação de sinais provenientes da matriz e a obtenção de cromatogramas mais seletivos. Para a

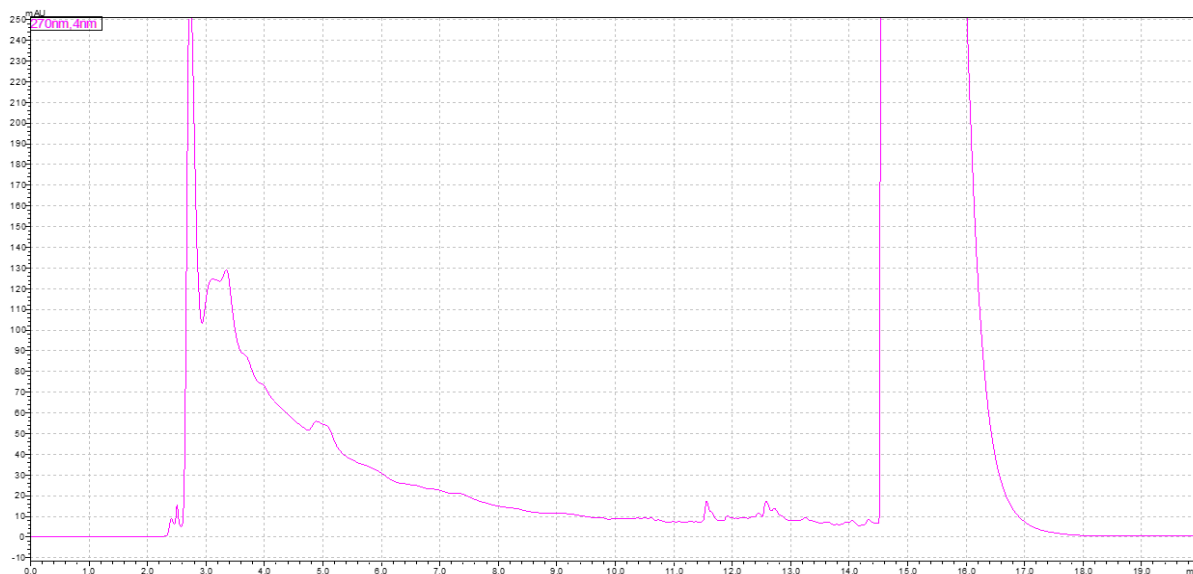
amostra A, referente ao indivíduo não exposto às sulfonamidas, as Figuras 11 e 12 apresentam os cromatogramas do branco e da amostra teste, respectivamente, enquanto a Figura 13 mostra o cromatograma resultante da subtração. Observa-se a remoção eficiente dos picos interferentes, resultando em um perfil cromatográfico limpo, sem a presença de sinais atribuíveis aos analitos de interesse, o que evidencia a seletividade do método.

Figura 11. Cromatograma usado como branco da amostra A.



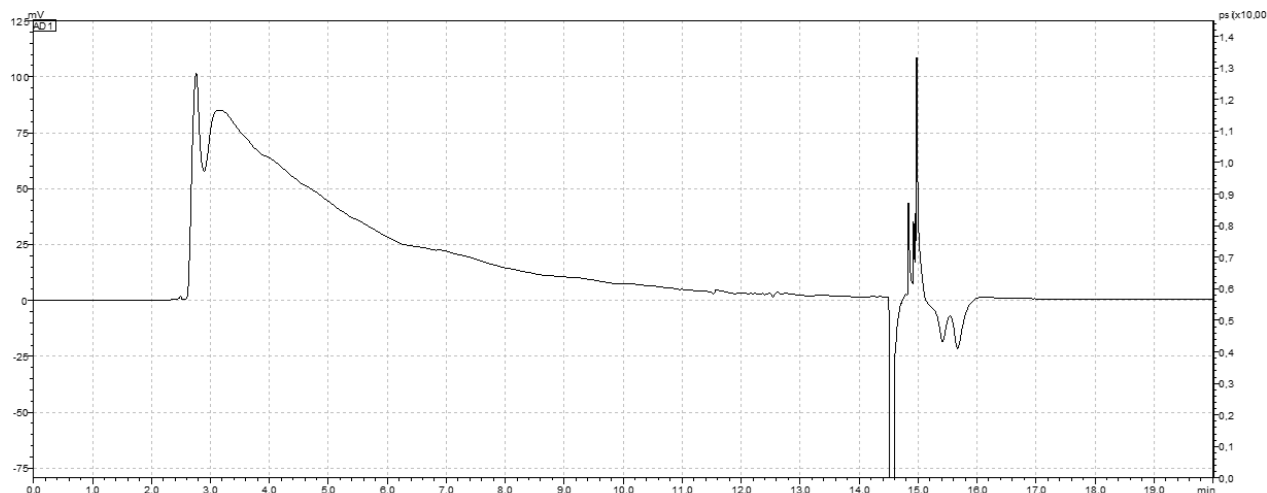
Fonte: Autoria própria (2026).

Figura 12. Cromatograma usado como amostra teste da amostra A.



Fonte: Autoria própria (2026).

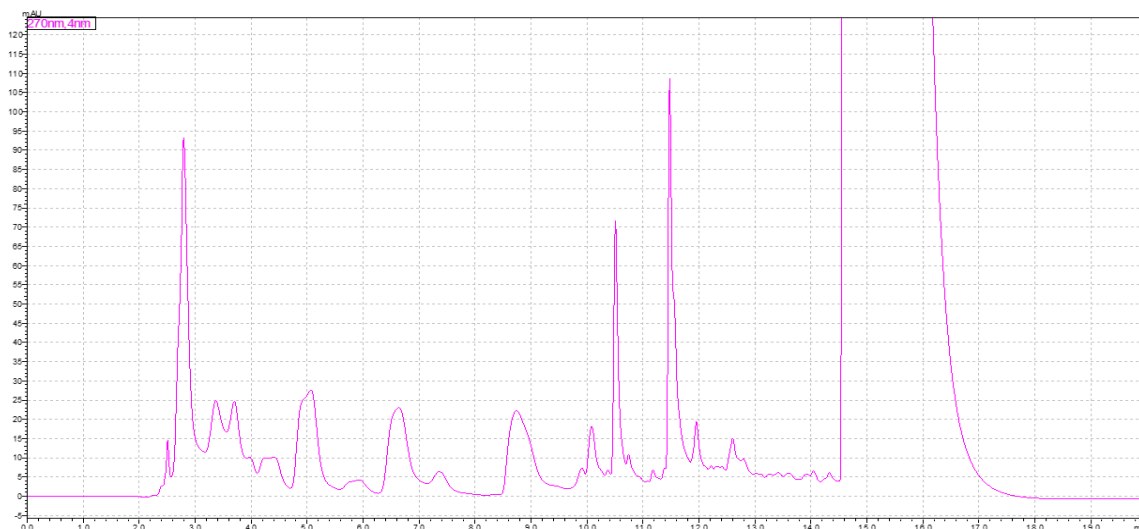
Figura 13. Cromatograma resultante da subtração da amostra A.



Fonte: Autoria própria (2026).

Para a amostra B, proveniente do indivíduo em uso de sulfametoxazol, as Figuras 14 e 15 correspondem aos cromatogramas do branco e da amostra teste, respectivamente, e a Figura 16 apresenta o cromatograma obtido após subtração. Nesse caso, observa-se um pico bem definido no tempo de retenção de aproximadamente 10,5 minutos, com uma área de 10551, característico do sulfametoxazol, confirmando sua presença na amostra. A aplicação da subtração cromatográfica permitiu reduzir significativamente a interferência da matriz, facilitando a identificação do analito mesmo em uma matriz complexa.

Figura 14. Cromatograma usado como branco da amostra B.



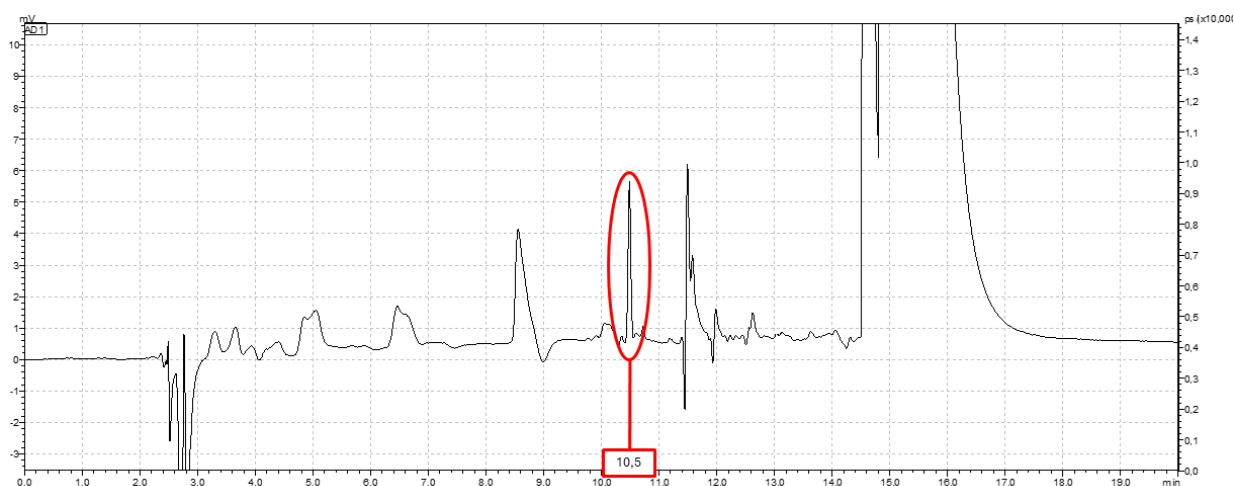
Fonte: Autoria própria (2026).

Figura 15. Cromatograma usado como amostra teste da amostra B.



Fonte: Autoria própria (2026).

Figura 16. Cromatograma resultante da subtração da amostra B.



Fonte: Autoria própria (2026).

Ainda, com o valor de área obtida para o pico indicado, foi possível através da curva analítica, obter um valor de concentração para este analito na amostra, de $61 \mu\text{g L}^{-1}$.

Dessa forma, os resultados demonstram que a metodologia proposta, associada ao tratamento de dados cromatográficos, apresenta adequada seletividade e aplicabilidade para a determinação de sulfonamidas em amostras reais de urina, sendo possível inclusive a quantificação quando presentes. A estratégia adotada mostrou-se eficaz na minimização de interferências da matriz,

contribuindo para a confiabilidade dos resultados analíticos e evidenciando o potencial do método para aplicações em análises de rotina.

5.7. Comparação da Metodologia com Estudos Previamente Reportados

A Tabela 11 apresenta uma comparação entre a metodologia proposta e métodos descritos na literatura para determinação de sulfonamidas em matrizes biológicas. De maneira geral, a HF-MMLLE utilizando um solvente eutético profundo hidrofóbico (timol:C₆, 2:1 razão molar) apresentou desempenho competitivo em relação às demais estratégias de preparo de amostras. Embora empregue um volume de amostra intermediário (1,5 mL), quando comparado às metodologias avaliadas, a principal vantagem observada foi o tempo médio de preparo por amostra, de aproximadamente 0,98 minutos, valor significativamente inferior aos reportados na literatura, que variam entre 10 e 55 minutos. Cabe ressaltar que esse tempo corresponde ao processamento simultâneo das amostras no sistema de placas de 96 poços, refletindo a elevada frequência analítica proporcionada pela metodologia, e não ao preparo individual de cada amostra. Esse aspecto evidencia o potencial do método para aplicações que demandam elevada produtividade e análise de grande número de amostras.

Além da elevada frequência analítica, a utilização de um DES como fase extratora representa uma alternativa alinhada aos princípios da Química Analítica Verde, substituindo solventes orgânicos convencionais e reduzindo o impacto ambiental do preparo de amostras. No que se refere à instrumentação, apesar de alguns métodos empregarem detectores mais sensíveis, como LC-MS/MS, a combinação entre HF-MMLLE e HPLC-DAD proporcionou limites de quantificação adequados e recuperações satisfatórias para todos os analitos estudados. Considerando ainda que detectores por arranjo de diodos apresentam menor custo de aquisição e manutenção e são amplamente disponíveis em laboratórios de rotina, a metodologia proposta demonstra-se uma alternativa simples, rápida, sustentável e analiticamente confiável para a determinação de sulfonamidas em amostras de urina.

Tabela 11. Tabela comparativa de trabalhos publicados na literatura com o método proposto.

Analitos	Técnica de preparo de amostras	Fase extratora	Volume de amostra	Média de tempo do preparo de amostra/ por amostra (min)	Instrumentação	Ref.
SDZ STZ SMP SMTX	HF-MMLLE	DES (Timol:C ₆ 2:1, fração molar)	1,5 mL	0,98	HPLC-DAD	Este trabalho
SDZ SMT SMR SMTX	μ-LPME	Tributil Fosfato	10 μL	10	HPLC-DAD	[49]
STZ SMR SMTX SDMX	SALLE + online SPE	ACN + resina de troca aniônica AX	400 μL	13	HPLC-DAD	[50]
SDZ SMR SGD SFA	IS-μ-dSPE	Microesferas de poliestireno sulfonado (sPS)	4 mL	35	HPLC-MS/MS	[51]
SDZ SMT	Diluição + QuEChERS d-SPE	Kit roQ™ QuEChERS d-SPE	0,5 mL	55	LC-QqQ-MS/MS	[52]

Legenda: SMT: sulfametazina; SMR: sulfamerazina; SDMX: sulfadimetoxina; SGD: sulfaguanidina; SFA: sulfanilamida; μ-LPME: micro microextração em fase líquida; SALLE: extração líquido-líquido por *salting-out*; IS-μ-dSPE: microextração em fase sólida dispersiva por seringa; HPLC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com duplo quadrupolo; HPLC-QqQ-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com triplo quadrupolo.

6. CONCLUSÕES

A metodologia empregada neste estudo para a determinação de sulfonamidas, tais como sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametóxi piridazina e sulfametoxazol, que consiste na utilização de DES como fase extratora na técnica de HF-MMLLE, com quantificação por HPLC-DAD, demonstrou resultados satisfatórios. A possibilidade de integração da técnica com o sistema de 96 poços de amostragem, além de apresentar vantagens do ponto de vista analítico em termos de frequência analítica, também apresenta vantagens do ponto de vista ambiental, visto o fato da metodologia estar alinhada aos princípios da Química Analítica Verde. A metodologia foi otimizada e validada com êxito, destacando o potencial dos solventes eutéticos profundos como substitutos eficazes dos solventes orgânicos tradicionalmente empregados. Os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados de forma satisfatória, demonstrando a confiabilidade do método proposto, com limites de quantificação de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e coeficientes de determinação adequados para todos os analitos. As precisões intradia e interdia, assim como as recuperações relativas, apresentaram resultados dentro da faixa determinada pela AOAC, notabilizando a eficácia do método proposto. Também, a aplicação da metodologia em amostras reais, aliada ao uso do software *LCSolution* presente no equipamento de análise, evidenciou a possibilidade de eliminação de interferentes, demonstrando que mesmo uma matriz de caráter mais complexo é passível de ser adequadamente analisada.

Apesar dos resultados promissores obtidos, algumas limitações da metodologia devem ser consideradas. A aplicação do método depende da obtenção prévia dos solventes eutéticos profundos (DES), etapa que requer o preparo da fase extratora antes de sua utilização. Além disso, a determinação foi realizada por HPLC-DAD, cujos limites de detecção e quantificação são inerentemente superiores aos alcançados por detectores mais sensíveis, como a espectrometria de massas, restringindo a determinação de concentrações ainda menores dos analitos. Também não foram avaliadas a robustez do método, a reutilização das membranas microporosas de fibra oca e a contribuição da membrana isoladamente para o processo de extração. Como perspectivas, tem-se a aplicação da metodologia a um maior número de amostras reais, a investigação do efeito matriz, a avaliação da reutilização e da capacidade extratora da membrana, bem como a determinação

da robustez do método, assim como a aplicação de métricas verdes (como AGREEprep ou GAPI) para uma avaliação quantitativa do desempenho ambiental da metodologia proposta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹I. H. EL-QALIEI, M. et al. Sulfonamides: Synthesis and the recent applications in Medicinal Chemistry. *Egyptian Journal of Chemistry*, v. 63, n. 12, p. 5289–5327, 12 ago. 2020.
- ²HOFF, R.; PIZZOLATO, T. M.; DIAZ-CRUZ, M. S. Trends in sulfonamides and their by-products analysis in environmental samples using mass spectrometry techniques. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 9, p. 24–36, jan. 2016.
- ³OVUNG, A.; BHATTACHARYYA, J. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*, v. 13, n. 2, p. 259–272, 29 mar. 2021.
- ⁴WANG, Y. et al. Impact of low-level exposure to antibiotics on bile acid homeostasis in adults: Implication for human safety thresholds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 279, p. 116451, 1 jul. 2024.
- ⁵BARAN, W. et al. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, v. 196, p. 1–15, 30 nov. 2011.
- ⁶HALLER, M. Y. et al. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, v. 952, n. 1–2, p. 111–120, 5 abr. 2002.
- ⁷LI, S. et al. Ecological risks of sulfonamides and quinolones degradation intermediates: Toxicity, microbial community, and antibiotic resistance genes. *Bioresource Technology*, v. 418, p. 131967, 1 fev. 2025.
- ⁸HU, J. et al. Comparison of chemical and biological degradation of sulfonamides: Solving the mystery of sulfonamide transformation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 424, p. 127661, 15 fev. 2022.
- ⁹HAJRULAI-MUSLIU, Z. et al. Multi-class/residue method for determination of veterinary drug residues, mycotoxins and pesticide in urine using LC-MS/MS technique. *BMC veterinary research*, v. 19, n. 1, p. 156, 14 set. 2023.

¹⁰BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne (PCRC), Mel (PCRM), Leite (PCRL) e Pescado (PCRP). *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 22 dez. 1999.

¹¹AUSTRÁLIA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. *Acceptable daily intakes (ADI) for agricultural and veterinary chemicals*. Edition 1, March 2025. Canberra: APVMA, 2025.

¹²UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia. *Regulamento (UE) n.º 37/2010, de 22 de dezembro de 2009*. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 15/1, Bruxelas, 20 jan. 2010.

¹³ORTENGREN, B.; MAGNI, L.; BERGAN, T. Development of sulphonamide-trimethoprim combinations for urinary tract infections. Part 3: Pharmacokinetic characterization of sulphadiazine and sulphamethoxazole given with trimethoprim: Part 3: Pharmacokinetic characterization of sulphadiazine and sulphamethoxazole given with trimethoprim. *Infection*, v. 7 Suppl 4, n. S4, p. S371-81, 1979.

¹⁴ANDREASEN, F. *et al.* Pharmacokinetics of sulfadiazine and trimethoprim in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 14, n. 1, p. 57–67, 1978.

¹⁵HELENA, H. *et al.* Current applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biologically important analytes in urine (2017 to mid-2021): A review. *Journal of Separation Science*, v. 45, n. 1, p. 305–324, jan. 2022.

¹⁶WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *The world's medicines situation*. Geneva, 2004.

¹⁷FONTOURA, B. M.; BARROS, A. I.; NÓBREGA, J. A. Analysis of urine by MIP-OES: challenges and strategies to correct matrix effects. *Analytical Methods*, v. 15, n. 2, p. 54–163, 6 jan. 2023.

- ¹⁸GENG, M. et al. Urinary antibiotic exposure across pregnancy from Chinese pregnant women and health risk assessment: Repeated measures analysis. *Environment International*, v. 145, p. 106164, 1 dez. 2020.
- ¹⁹WANG, H. et al. Urinary antibiotic level of school children in Shanghai, East China, 2017–2020. *Environmental Pollution*, v. 291, p. 118167, 15 dez. 2021.
- ²⁰UNITED STATES. Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*. Silver Spring, MD: Food and Drug Administration, 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/70858/download>.
- ²¹INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). *ICH M10: Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis*. Geneva: ICH, 2022. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>
- ²²BOUATRA, S. et al. The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e73076, 4 set. 2013.
- ²³PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 91, p. 12–25, jun. 2017.
- ²⁴CARASEK, E.; MORÉS, L.; HUELSMANN, R. D. Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications, and directions. *Analytica Chimica Acta*, v. 1192, p. 339383, 1 fev. 2022.
- ²⁵PIERRI, M. E. et al. Multiclass determination of endocrine disruptors in urine by hollow fiber microporous membrane and liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 652, p. 114725, 1 set. 2022.
- ²⁶MORELLI, D. C. et al. A green - high throughput – extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1626, p. 461377, ago. 2020.

²⁷CARASEK, E.; MORÉS, L.; MERIB, J. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 19, p. e00060, 1 jul. 2018.

²⁸SANTOS, Amanda Vitória. Uso de solvente eutético profundo natural como fase extratora associada à microextração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca para determinação de biomarcadores de câncer de pulmão em urina. 2023. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

²⁹VIEIRA, Camila Maiara dos Santos. Desenvolvimento de método empregando microextração em fase líquida suportada por membrana oca (HF-LPME) para determinação de sulfonamidas em água superficial por HPLC-DAD. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

³⁰SOLTANI, S.; SERESHTI, H. A green alternative QuEChERS developed based on green deep eutectic solvents coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticides in tea samples. *Food Chemistry*, v. 380, p. 132181, 30 jun. 2022.

³¹SHAKIROVA, F.; SHISHOV, A.; BULATOV, A. Automated liquid-liquid microextraction and determination of sulfonamides in urine samples based on Schiff bases formation in natural deep eutectic solvent media. *Talanta*, v. 234, p. 122660, nov. 2021.

³²MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. 2013.

³³ZORITA, S.; BARRI, T.; MATHIASSEN, L. A novel hollow-fibre microporous membrane liquid-liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1157, n. 1–2, p. 30–37, jul. 2007.

³⁴MORELLI, Diogo Cherem. Solventes eutéticos profundos e microextração líquido-líquido em membrana microporosa por fibra oca: uma alternativa verde e eficiente para a determinação de contaminantes emergentes. 2023. 112 f. Tese (Doutorado)

– Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

³⁵LOPES, Daniela et al. Hollow-fiber renewal liquid membrane extraction coupled with 96-well plate system as innovative high-throughput configuration for the determination of endocrine disrupting compounds by high-performance liquid chromatography fluorescence and diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 1040, p. 33–40, 21 dez. 2018.

³⁶DÍAZ-ÁLVAREZ, M.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Preparation and further evaluation of l-menthol-based natural deep eutectic solvents as supported liquid membrane for the hollow fiber liquid-phase microextraction of sulfonamides from environmental waters. *Advances in Sample Preparation*, v. 4, p. 100047, 1 out. 2022.

³⁷CORAZZA, Gabriela. Explorando o uso de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração para a determinação de poluentes em amostras ambientais, contaminantes em amostras alimentícias e biomonitoramento de compostos orgânicos em amostras biológicas. 2020. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

³⁸ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Electronic supplementary information (ESI) available: spectroscopic data. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b2/b210714g/>. *Chemical Communications*, n. 1, p. 70–71, 19 dez. 2003.

³⁹HANSEN, B. B. et al. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, v. 121, n. 3, p. 1232–1285, 10 fev. 2021.

⁴⁰SPITTLE, S. et al. Author Correction: Evolution of microscopic heterogeneity and dynamics in choline chloride-based deep eutectic solvents. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 1081, 22 fev. 2022.

⁴¹EL ACHKAR, T.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 19, n. 4, p. 3397–3408, ago. 2021.

⁴²ESPINO, M. et al. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 76, p. 126–136, 1 fev. 2016.

⁴³DELGADO, Daniel R. et al. Validación de una metodología analítica empleando espectrofotometría ultravioleta para el estudio de la solubilidad de algunas sulfonamidas en mezclas cosolventes alcohol + agua. *Revista Colombiana de Química*, Bogotá, v. 42, n. 3, p. 31–40, 2013.

⁴⁴PIERRI, Maria Eduarda. Solvente eutético profundo como fase extratora na técnica de extração líquido-líquido de membrana microporosa de fibra oca para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água de chuva. 2022. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

⁴⁵BACCARIN, Marina; CERVINI, Priscila; CAVALHEIRO, Eder Tadeu Gomes. Comparative performances of a bare graphite-polyurethane composite electrode unmodified and modified with graphene and carbon nanotubes in the electrochemical determination of escitalopram. *Talanta*, v. 178, p. 1024–1032, 1 fev. 2018.

⁴⁶WILL, C. et al. High-throughput approach for the *in situ* generation of magnetic ionic liquids in parallel-dispersive droplet extraction of organic micropollutants in aqueous environmental samples. *Talanta*, v. 223, p. 121759, 1 fev. 2021.

⁴⁷AOAC INTERNATIONAL. *AOAC guidelines for analytical method validation*. Rockville: AOAC International, 2023. 28 p.

⁴⁸CHAMBERS, E. et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, v. 852, n. 1-2, p. 22–34, jun. 2007.

⁴⁹DOWLATSHAH, S. et al. A selective and efficient microfluidic method-based liquid phase microextraction for the determination of sulfonamides in urine samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1652, p. 462344–462344, 15 jun. 2021.

⁵⁰FIKAROVÁ, Kateřina *et al.* Lab-In-Syringe for automated double-stage sample preparation by coupling salting out liquid-liquid extraction with online solid-phase extraction and liquid chromatographic separation for sulfonamide antibiotics from urine. *Talanta*, v. 221, n. 121427, p. 121427, 2021.

⁵¹ANTONELLI, L. et al. Sulfonated polystyrene nanospheres from waste sources for the extraction of sulfonamide antibiotics from complex matrices. *Microchimica Acta*, v. 193, n. 3, 16 fev. 2026.

⁵²HUANG, W. et al. Determination of 18 antibiotics in urine using LC-QqQ-MS/MS. *Journal of chromatography. B*, v. 1105, p. 176–183, 1 jan. 2019.

APÊNDICE A – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS REALIZADOS PARA SELEÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO

Tabela A-1. Dados da ANOVA para os solventes de extração.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p-valor
Entre grupos	12	16165,22066	1347,10172	7,47481	<0,0001
Dentro dos grupos	39	7028,53632	180,21888		
Total	51	23193,75699			

Tabela A-2. Teste de Tukey para os solventes de extração.

DES	Média	Grupo			
Timol:C6 (3:1)	94,5648	A			
Timol:C6 (2:1)	77,31137	A	B		
Timol:C6 (3:2)	73,74016	A	B	C	
Timol:C7 (3:2)	65,73293	A	B	C	
Timol:C8 (2:1)	65,31514	A	B	C	
Timol:C7 (2:1)	65,2438	A	B	C	
Timol:C8 (3:2)	57,63372		B	C	D
Timol:C10 (3:2)	53,50465		B	C	D
Timol:C6 (1:1)	50,13867		B	C	D
Timol:C8 (1:1)	42,31985			C	D
Timol:C10 (2:1)	41,86839			C	D
Timol:C7 (1:1)	40,55699			C	D
Timol:C10 (1:1)	25,97876				D

Legenda: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

APÊNDICE B – DADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS REALIZADOS PARA SELEÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO

Tabela B-1. Dados da ANOVA para os tempos de dessorção.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p-valor
Entre grupos	3	3553,6613	1184,55377	4,87142	0,01928
Dentro dos grupos	12	2917,9685	243,16404		
Total	15	6471,6298			

Tabela B-2. Teste de Tukey para os tempos de dessorção.

Tempo (min)	Média	Grupo
25	97,09619	A
20	95,74935	A
15	74,19543	A B
10	61,73391	B

Legenda: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

APÊNDICE C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de técnicas de microextração para a determinação de potenciais biomarcadores em matrizes biológicas (urina e saliva)

Pesquisador: EDUARDO CARASEK DA ROCHA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 00913718.3.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.986.787

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do professor Dr. Eduardo Carasek da Rocha e da Dra. Gabrieli Bernardi, do Departamento de Química/UFSC. Estudo experimental de laboratório para otimização de método de extração de biomarcadores, com seis (6) participantes. Critérios de inclusão: assinatura do TCLE. Critérios de exclusão: não se aplica. Intervenções: coleta de amostras de urina e de saliva

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Desenvolver metodologias analíticas inovadoras baseadas em técnicas de microextração para a determinação de compostos orgânicos que possam servir de potenciais biomarcadores de alguns tipos de doenças e de exposição não intencional em amostras biológicas (urina e saliva).

Objetivo Secundário: Os objetivos secundários são: 1) Sintetizar os líquidos iônicos magnéticos (novas fases extratoras); 2) Propor fases extratoras alternativas para utilização na microextração em ponteiros; 3) Caracterizar as fases extratoras; 4) Otimizar as variáveis experimentais incluindo tempo de extração, ajuste de pH, volume de amostra, volume de solvente, entre outras; 5) Verificar o comportamento das novas fases extratoras em matrizes biológicas (urina e saliva); 6) Otimizar os métodos cromatográficos de análise para utilização em matrizes biológicas (urina e saliva); 7) Proporcionar aos alunos envolvidos conhecimentos a respeito das técnicas de preparo de amostra e cromatográficas.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.986.787

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Análise adequada dos riscos e benefícios.

Riscos: Informados no formulário da PB - Uso da amostra para novas pesquisas sem a autorização do voluntário; - Invasão de privacidade; - Divulgação de dados confidenciais.

Informados no TCLE: Esta pesquisa implica em riscos mínimos inerentes a coleta de urina e saliva. Você terá acesso a um lugar reservado para coleta das amostras e receberá instruções e material apropriado para isso. Entendemos que a pesquisa praticamente não oferecerá riscos, no entanto, é necessário dizer que quem sentir algum desconforto em participar, a qualquer momento de sua participação, poderá desistir. Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo).

Benefícios: Os benefícios esperados ao participar dessa pesquisa envolvem a contribuição para o desenvolvimento de métodos que poderão servir de ferramenta para o diagnóstico precoce de algumas doenças e/ou monitoramento de compostos que indiquem contaminação não intencional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto assinado pelo pesquisador responsável e pelo Chefe do Departamento de Química, Consentimento institucional nos termos da resolução 466/12 assinada pelo chefe do Departamento. Cronograma informando que a obtenção das amostras ocorrerá entre novembro de 2018 e fevereiro de 2019. TCLE atende a resolução 466/12.

Recomendações:

Embora a previsão de risco esteja adequada, recomenda-se incluir no TCLE o risco, ainda que involuntário e não intencional, de quebra de sigilo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 2.986.787

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1216381.pdf	09/10/2018 19:32:41		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_pendencia.pdf	09/10/2018 13:09:44	Gabrieli Bernardi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CEP_reformulado.pdf	09/10/2018 12:57:49	Gabrieli Bernardi	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_.pdf	24/09/2018 14:12:56	Gabrieli Bernardi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_instituicao.pdf	24/09/2018 13:59:49	Gabrieli Bernardi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_cep.pdf	24/09/2018 13:36:25	Gabrieli Bernardi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 29 de Outubro de 2018

**Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))**

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br