

## OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM CAMARÃO CULTIVADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR UV

Paloma Nascimento dos Santos e Maria Inês Sucupira Maciel\*

Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife – PE, Brasil

Beatriz Regina Brito de Oliveira Lavorante, Marcelo de Mélo Medeiros e Eden Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Unidade de Agrotóxicos e Contaminantes em Alimentos e de Produtos Alcoólicos, Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Av. Prof. Luiz Freire, 700, 50740-540 Recife – PE, Brasil

Recebido em 8/10/10; aceito em 3/2/11; publicado na web em 15/4/11

OPTIMIZATION AND VALIDATION MULTIRESIDUE METHOD FOR SULFONAMIDES DETERMINATION IN SHRIMP BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DETECTION BY UV. This work reports the optimization and method validation for sulfonamides (sulfamethazine, sulfaquinoxaline, sulfadimethoxine and sulfathiazole) in shrimp muscle using HPLC-UV. The sulfonamides were extracted with acetonitrile and acetic acid, and the extract cleaned up with a Strata SCX SPE cartridge prior to analysis. The method presented linearity in the range of 20-120  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , good linear correlation ( $r > 0.99$ ), and limits of quantification in the range of 4.7-20.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The recovery for shrimp muscles spiked with 50-150  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ranged from 63.2-108.0%. Precision and accuracy analysis showed acceptable relative standard deviation. Commercial shrimps were analyzed and sulfonamides don't were found above of the method limit of quantification.

Keywords: sulfonamides; shrimp; HPLC-UV.

### INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de antimicrobianos está disponível para uso na medicina veterinária, inclusive na aquicultura. Entre esses, destacam-se os antimicrobianos das classes dos  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e anfenícois, que são compostos que inibem o crescimento de determinados micro-organismos, sendo utilizados na produção animal para tratar e prevenir enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos e melhorar a taxa de crescimento ou conversão alimentar.<sup>1</sup> Dentre os antimicrobianos sintéticos, as sulfonamidas (SAs) são um importante grupo que tem sido usado efetivamente no combate às infecções bacterianas e também na prática veterinária para promover o crescimento animal (Figura 1).

O termo sulfonamida é utilizado para referir-se aos derivados do *para*-amino-benzeno-sulfonamida (sulfanilamida). O grupo *p*-NH<sub>2</sub> desses compostos é essencial e só pode ser substituído por radicais capazes de serem convertidos *in vivo* em grupos amino livre. Essas substituições possuem efeitos variáveis sobre a atividade antibacteriana da molécula. As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido *para*-aminobenzoico (PABA) e impedem a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico ou vitamina B9. Mais especificamente, as sulfonamidas são inibidores competitivos da di-hidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido di-hidropteroico, precursor imediato do ácido fólico. Os micro-organismos sensíveis são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico, as bactérias capazes de utilizar o folato pré-formado não são afetadas.<sup>2</sup>

A carcinicultura é uma das áreas mais consolidadas do agro-

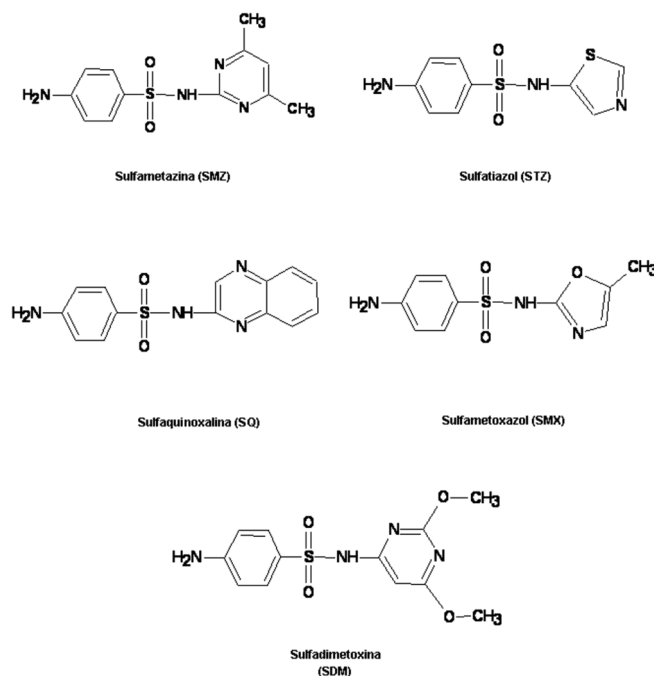


Figura 1. Estruturas químicas das sulfonamidas

negócio brasileiro, sendo a região Nordeste produtora de mais de 90% de todo o camarão cultivado no Brasil que, em sua maioria, é destinado ao mercado europeu.<sup>3</sup> Apesar do crescimento acelerado até 2003, a carcinicultura brasileira enfrentou alguns desafios nos anos seguintes, como a aplicação de taxas pelos países importadores e o surgimento de doenças infecciosas nos animais cultivados, fatos que levaram a uma perda de 15,9% na produção.<sup>4</sup> Para combater o

\*e-mail: m.ines@dcd.ufrpe.br

ciclo crescente de doenças, uma alternativa viável foi a utilização de antimicrobianos. Em 2000, um estudo realizado em fazendas de cultivo de camarão na Tailândia constatou que 74% dos produtores utilizavam antimicrobianos administrados na ração dos animais e dentre os grupos de compostos mais usados se destacaram as fluoroquinolonas, as tetraciclina e as sulfonamidas.<sup>5,6</sup> Recentemente foi publicado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) uma compilação com os 26 antimicrobianos mais potencialmente usados na aquicultura mundial.<sup>7</sup> Desses compostos examinados, a oxitetraciclina destacou-se como o antimicrobiano mais usado seguido do cloranfenicol e de sulfonamidas como a sulfametazina, sulfadimidina e sulfadimetoxina, que também são listadas quando combinadas com o composto trimetropina.<sup>8</sup> No Brasil, já foram relatados estudos sobre o uso das sulfonamidas na carcinicultura e também referenciaram seu uso em associação com a trimetropina.<sup>9</sup>

A presença de resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal também tem requerido especial atenção por causa do potencial risco à saúde humana. Diversos estudos têm reportado os possíveis efeitos carcinogênicos das sulfonamidas; uma pesquisa demonstrou a presença de tumores em roedores ocasionados pelo uso da sulfametazina.<sup>10-15</sup>

Devido às exigências dos mercados consumidores quanto à segurança alimentar, programas e normas baseados em legislações cada vez mais exigentes vêm sendo criados para fiscalizar os níveis dessas substâncias danosas à saúde humana, estabelecendo-se para as diversas matrizes de origem animal, limites máximos de resíduos (LMR) permitidos.<sup>16,17</sup> No Brasil, o limite máximo de resíduo estabelecido para sulfonamidas em músculo de camarão é 100 µg kg<sup>-1</sup>, o mesmo adotado pela Comunidade Europeia.<sup>18,19</sup>

O desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos requer o domínio de importantes etapas que vão desde o conhecimento das características físico-químicas dos analitos, seleção das melhores condições cromatográficas, otimização dos processos de extração e *clean-up*, até a avaliação de conformidade de amostras comerciais. Dentre os diversos estudos disponíveis na literatura para determinação de sulfonamidas em músculo de camarão, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido reportada como técnica analítica frequentemente utilizada devido a sua precisão e recuperação satisfatórias.<sup>20-23</sup>

Este trabalho teve como objetivo otimizar e validar um método multirresíduo para determinação de sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina) em músculo de camarão comercial utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes e materiais

Foram utilizados acetronitrila, acetato de etila e metanol, todos de pureza cromatográfica (J.T. Baker<sup>®</sup>), acetona grau CLAE (Mallinckrodt Chemicals<sup>®</sup>), ácido acético glacial (J.T. Baker<sup>®</sup>), hidróxido de amônio a 25% grau ACS (Merck<sup>®</sup>), *n*-hexano com grau de pureza ACS (J.T. Baker<sup>®</sup>) e sulfato de sódio anidro de grau analítico (F. Maia<sup>®</sup>).

Os cartuchos utilizados para extração em fase sólida foram do tipo Strata SCX (sorbente ácido benzenossulfônico) de 500 mg/3 mL, adquiridos da Phenomenex<sup>®</sup>, e as membranas para filtração de 0,45 µm, em celulose regenerada, foram fornecidas pela Millipore<sup>®</sup>. A água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>) foi utilizada no preparo das soluções.

Os padrões analíticos foram obtidos da United States Pharmacopeia<sup>®</sup> (USP) com graus de pureza de 100% para a sulfatiazol (STZ),

sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQ). A sulfametoxazol (SMX), com grau de pureza de 99,7 %, foi utilizada como padrão interno e obtida da Farmacopeia Brasileira<sup>®</sup>.

### Aquisição e preparação de amostras de camarão

Para os testes de validação do método foi utilizado camarão (*Litopenaeus vannamei*) (branco da matriz) cultivado em sistema orgânico isento de resíduos de qualquer tipo de antimicrobianos e/ou outras drogas veterinárias. Estes camarões foram coletados de uma fazenda de camarão do Rio Grande do Norte - RN, onde a qualidade dos mesmos foi garantida pelo selo de qualidade da Associação de Certificação Instituto Biodinâmico - IBD (certificação para produtos orgânicos). Seis amostras dessa fazenda, com cerca de 1 kg de camarão, foram acondicionadas em sacos plásticos e enviadas ao laboratório em caixa de isopor com gelo. O tempo decorrido entre a coleta e chegada ao laboratório não ultrapassou 24 h.

As amostras foram preparadas imediatamente após sua chegada ao laboratório. Para isto, primeiramente foram retiradas a cabeça e a casca dos camarões e 1 kg de músculo foi triturado em liquidificador industrial até a obtenção de uma massa pastosa e homogênea que foi, em seguida, dividida em duas porções de aproximadamente 500 g. Cada porção foi acondicionada em embalagem de alumínio com tampa, devidamente identificada e armazenada em refrigerador (-20 °C).

### Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque (100 mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas individualmente a partir dos padrões analíticos de sulfonamidas dissolvidos em metanol grau CLAE. As soluções intermediárias (soluções de trabalho) consistiram de uma mistura das sulfonamidas e foram preparadas em ácido acético 0,5% das soluções estoque. A partir dos estudos de estabilidade dos padrões analíticos em solução, foi estabelecida a validade de 6 meses para as soluções estoque, enquanto as soluções de trabalho foram preparadas e usadas no mesmo dia a partir da diluição da solução estoque. Todas as soluções, estoque e intermediárias (soluções de trabalho), além dos padrões analíticos de cada sulfonamida foram armazenados em refrigerador à -20 °C sob o abrigo da luz. As condições de armazenamento e prazo de utilização das soluções foram estabelecidas após um estudo prévio realizado sobre a estabilidade das sulfonamidas em solução.<sup>24</sup>

### Instrumentação e condições cromatográficas de análise

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent<sup>®</sup> HP 1100 equipado com uma bomba de alta pressão quaternária (G1311A) e uma bomba isocrática (G1310A), desgaseificador (G1322A), injetor automático (G1313A), forno com temperatura controlada (G1316A), detector DAD (G1315A) e software Chemstation<sup>®</sup> 2002 para aquisição e processamento dos dados.

As condições cromatográficas definidas para separação e detecção das sulfonamidas compreenderam uma eluição de 32 min do tipo gradiente em uma coluna Merck<sup>®</sup> C18 (150 × 3 mm, 5 µm), mantida a uma temperatura de 38 °C por um forno e acoplada a uma coluna de guarda Merck<sup>®</sup> (4 × 2 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu em uma solução de acetronitrila e ácido acético 0,5% conduzida pelo sistema a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. O comprimento de onda utilizado pelo detector foi de 227 nm e volume de injeção de 50 µL.

Também foram utilizados: processador ultrassônico/homogeneizador de amostra (CE compliant, Sigma-aldrich, EUA), vórtex Phoenix<sup>®</sup> AP 56, mesa agitadora Ika<sup>®</sup> KS 130 Basic (IKA, EUA), centrífugas Jouan<sup>®</sup> B4i (Jouan, EUA) e Sorvall<sup>®</sup> (Thermo Scientific,

Brasil), evaporador rotativo Büchi® R-200 (Büchi, EUA) com controle de pressão e temperatura para secagem do solvente de extração e Manifold Phenomenex® (Phenomenex, EUA) para otimização e auxílio à extração em fase sólida.

### Validação do método

As características de desempenho investigadas no processo de validação, a fim de demonstrar o desempenho do método foram os parâmetros de seletividade, limite de detecção e quantificação do método, linearidade, efeito de matriz, precisão (repetibilidade), precisão intermediária (reprodutibilidade) e exatidão (recuperação), os quais foram estimados a partir de recomendações adotadas pelo guia do INMETRO e pela literatura (ANVISA e IUPAC).<sup>25-27</sup>

#### Seletividade

Para verificar a seletividade do método foram preparados dois grupos de amostras - branco adicionado (mistura de sulfonamidas em solvente) e matriz fortificada (extrato da matriz extraída fortificada com a mistura de sulfonamidas) em duplicata, ambos com o analito na concentração estabelecida (LMR). Foram obtidos 7 valores de medição de cada grupo de amostras e calculados o desvio padrão e o coeficiente de variação da média das áreas dos analitos. A dispersão das medidas foi avaliada através do teste de Grubbs e a variância das amostras foi verificada através de teste *t* de Student.

#### Limites de detecção (LDM) e quantificação (LQM) do método

O limite de detecção (LD) de um método é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais, enquanto o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais. Os limites de detecção (LDM) e quantificação (LQM) foram calculados através da relação sinal/ruído para cada sulfonamida analisada, os quais foram obtidos a partir de 7 réplicas autênticas de extratos da matriz fortificados a uma concentração que gerou um sinal três vezes (LDM) e dez vezes (LQM) maior que o ruído do sistema.

#### Linearidade

As curvas analíticas para as sulfonamidas em camarão foram construídas usando o procedimento de fortificação do extrato da matriz pelo método da utilização de padrão interno (PI) de sulfametoxazol, sendo a curva linear o resultado da correlação entre a concentração de STZ/PI, SMZ/PI, SDM/PI e SQ/PI versus a área dos analitos/área do padrão interno. A sulfametoxazol foi a substância escolhida como padrão interno e foram feitas 7 injeções de cada nível da solução padrão e de cada nível do extrato da matriz fortificado nas concentrações de 20, 40, 80, 100, 120, 160 e 200 µg kg<sup>-1</sup> e as curvas foram construídas a partir dos valores médios de área para cada concentração estabelecida. Os coeficientes angular e linear (a e b, respectivamente) de cada curva analítica foram estimados por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados simples.

#### Efeito de matriz

Utilizando os valores de medição obtidos no teste de linearidade, foram comparados os valores de área entre os analitos preparados em solvente e no extrato da matriz. As diferenças foram avaliadas estatisticamente, através de teste *t*, as curvas de cada analito em solução e no extrato da matriz para definir se há diferenças ou semelhanças no grupo de medições, caracterizando ou não um efeito de matriz sobre a resposta cromatográfica.

#### Precisão (repetibilidade)

A precisão ou repetibilidade do método, ou seja, a concordância entre os resultados de sucessivas medições efetuadas sob as mesmas condições, foi avaliada por meio do coeficiente de variação (CV%) das médias das áreas obtidas de 7 réplicas autênticas das amostras fortificadas em uma faixa de concentração de 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR estabelecido, que corresponderam a 50, 100 e 150 µg kg<sup>-1</sup>.

#### Exatidão

A exatidão do método foi demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado de cada sulfonamida. Isso foi estabelecido a partir da recuperação de 3 fortificações da matriz a 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR, que corresponderam a 50, 100 e 150 µg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Foram realizadas 7 réplicas autênticas de cada uma das concentrações e as médias comparadas percentualmente com os valores teóricos.

### Procedimento

O método utilizado para a validação foi adaptado de Stubbings *et al.*<sup>28</sup> Após a retirada da carapaça, o músculo do camarão foi homogeneizado em liquidificador industrial de alta velocidade. Pesaram-se cuidadosamente 5,0 ± 0,001 g dessa amostra de músculo de camarão moído em um tubo de centrífuga de 50 mL. Nessa etapa, a amostra foi fortificada com uma concentração conhecida da mistura de sulfonamidas. Após 30 min, foram adicionados a essa mistura 20 mL de acetonitrila. Essa foi homogeneizada com o auxílio de um processador ultrassônico por 3 min. A haste do ultrassom foi lavada com 10 mL de acetonitrila para retirar resíduos de músculo e recolhida junto com a mistura homogeneizada. A essa mistura foram adicionados 10 g de sulfato de sódio anidro e, em seguida, levada à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de rotação de 640 rpm por 10 min e centrifugada em seguida a 1700 rpm por 10 min.

O sobrenadante foi filtrado em 15 g de sulfato de sódio anidro, sendo o filtrado recolhido em um balão de fundo redondo de 100 mL para posterior rotaevaporação.

Foram acrescentadas duas porções de 5 mL de acetonitrila ao sulfato de sódio do papel de filtro e os extratos reunidos foram rotaevaporados a 40 °C. Ao resíduo seco foram adicionados 3 mL de uma solução acetonitrila:ácido acético (95:5, v/v), sendo esse extrato homogeneizado em vórtex antes de ser levado para a etapa de *clean up* em cartuchos do tipo SCX. O processo de limpeza foi realizado em um cartucho previamente condicionado com 5 mL da solução acetonitrila:ácido acético (95:5, v/v) que, depois da aplicação da amostra, foi lavado com 2,5 mL de acetona, 5 mL de metanol e 5 mL de acetonitrila.

As sulfonamidas foram eluídas com 5 mL da solução acetonitrila:hidróxido de amônio (95:5, v/v) e o eluato foi cuidadosamente rotaevaporado novamente a 40 °C. O resíduo seco foi dissolvido em 1 mL de uma solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v), homogeneizado em vórtex e filtrado em filtro para seringa do tipo millex (0,22 µm) acoplado a uma seringa de 1 mL, sendo o volume recolhido em um frasco de vidro com tampa de rosca de capacidade de 1,5 mL, apropriado para cromatografia para posterior análise por CLAE-UV.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados procedimentos para teste das condições cromatográficas a partir do método de Pecorelli *et al.*, que utilizaram como fase móvel uma mistura de acetonitrila e tampão acetato em pH 4,5.<sup>22</sup> O método foi escolhido por apresentar separação eficiente das sulfonamidas em um tempo razoável de eluição gradien-

te. O método foi otimizado ao ser efetuado um aumento da vazão (1 mL min<sup>-1</sup>), um controle de temperatura do forno e a substituição do tampão acetato por ácido acético a 0,5%. A opção por não trabalhar com uma fase móvel tamponada deve-se ao cuidado redobrado que é dado ao sistema quando se trabalha com esse tipo de fase móvel. A cristalização de sal na região do pistão da bomba pode ocorrer em sistemas que utilizam fase móvel tamponada, ocasionando danos ao corpo do pistão.

Além disso, optou-se também pela utilização de uma coluna cromatográfica em C18 para a separação das sulfonamidas, visto que a natureza anfotérica desses compostos dificultou a separação em colunas do tipo C<sub>8</sub>, sendo observadas separações ótimas quando foram utilizadas colunas do tipo C<sub>18</sub>. Outro fator sobre a otimização do método foi que as diferenças de polaridade entre os gradientes testados, quando comparados ao tampão acetato a pH 4,5 e a solução de ácido acético 0,5%, foram determinantes para a separação efetiva das sulfonamidas. Estudos demonstram que o uso do ácido acético 0,5% como fase móvel melhora a resolução e sensibilidade das bandas cromatográficas.<sup>29,30</sup>

O método descrito para detecção de sulfonamidas em camarão demonstrou ser eficientemente seletivo, pois não foram observados picos interferentes no tempo de retenção das SAs na matriz, além de existir concordância entre os tempos de retenção dos analitos na solução de trabalho e na matriz fortificada (Figura 1S, material suplementar). As sulfonamidas eluíram nos tempos aproximados de 4,7 min para a sulfatiazol, 8,5 min para a sulfametazina, 13,7 min para a sulfametoxazol, 21,4 min para a sulfadimetoxina e 22,4 min para a sulfaquinoxalina.

A linearidade e os limites de detecção e quantificação do método estão mostrados na Tabela 1. Os limites de quantificação e detecção do método foram calculados através da relação sinal/ruído para cada sulfonamida, obtidos a partir de 7 injeções de réplicas autênticas de um extrato da matriz fortificada a uma concentração de 4 a 20 µg kg<sup>-1</sup>, dependendo da sulfonamida.

A partir dos resultados de linearidade, obtidos através da verificação da variância e da regressão linear, obtiveram-se, nas faixas de concentração estabelecidas, coeficientes de correlação linear acima de 0,99. Os limites de detecção obtidos pelo método estão em conformidade e até em valores menores com outros estudos já publicados, estando de acordo também com as diretrizes estabelecidas

pela União Europeia.<sup>19,20</sup>

O efeito de matriz foi avaliado inicialmente com a aplicação do teste F para cada sulfonamida, presumindo 2 amostras para variâncias. Em seguida foi aplicado o teste *t* para 2 amostras, presumindo variâncias equivalentes. Caso  $F_{CAL} < F_{CRÍTICO}$ , significa que as variâncias são iguais e a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método. Para  $F_{CAL} > F_{CRÍTICO}$ , com variâncias diferentes, a matriz tem efeito importante sobre a precisão do método. Para efeito de conclusão, o teste *t* estabelece que, se  $t_{CAL} < t_{CRÍTICO}$ , a matriz não afeta o ensaio e se  $t_{CAL} > t_{CRÍTICO}$ , a matriz afeta o ensaio. A Tabela 2 e a Figura 2S, material suplementar, mostram os resultados obtidos no estudo sobre o efeito matriz no método.

Para as sulfonamidas estudadas, apesar da complexidade da matriz camarão, o efeito de matriz não foi estatisticamente significativo. Segundo Stubbings *et al.*, para compostos como as sulfonamidas, a etapa de extração em fase sólida contribui para a otimização do método e diminuição do efeito de matriz.<sup>28</sup> Segundo os autores, para uma extração eficiente nessa fase se faz necessário que tanto o analito quanto a fase estacionária estejam totalmente ionizados, sendo o controle de pH um ponto crítico.

Os ensaios de recuperações também se mostraram mais eficientes quando a acetona foi o componente primário na eluição e quando o sulfato de sódio anidro foi utilizado na etapa preliminar de extração, proporcionando a sua interação com moléculas de água da amostra, uma vez que as sulfonamidas são hidrossolúveis.

As recuperações e a repetibilidade do método (precisão) foram obtidas a partir de amostras de camarão fortificadas a 0,5; 1,0 e 1,5 do LMR para o conjunto de sulfonamidas. Foram realizadas 7 injeções independentes (réplicas autênticas) para cada uma das concentrações e a média dos resultados e os coeficientes de variação (CV %) são mostrados na Tabela 3.

A recuperação e o coeficiente de variação calculados para as concentrações estabelecidas estão dentro da faixa de 70 a 110% para recuperação e CV máximo de 20% para esses parâmetros, respectivamente, estabelecidos pelo Codex Alimentarius.<sup>31</sup> Apenas a sulfatiazol apresentou valor abaixo do estabelecido pela legislação, tendo sido registrada uma recuperação de 63,2% para a concentração de 150 µg kg<sup>-1</sup>. Os valores de recuperação encontrados pelo método validado foram superiores ou equivalentes aos definidos por outros estudos que utilizaram CLAE como técnica de análise.<sup>20</sup>

**Tabela 1.** Resumo dos resultados obtidos para os parâmetros de validação, linearidade e limites de detecção e quantificação do método

Analito	Faixa linear (µg kg <sup>-1</sup> )	Limites de Detecção do método (µg kg <sup>-1</sup> )		a*	b*	r
		LD	LQ			
STZ	20,0 – 200,0	6,3	20,2	0,001	0,03	0,999
SMZ		2,4	7,8	0,001	0,03	0,999
SDM		1,5	4,7	0,002	0,05	0,997
SQ		3,4	10,8	0,001	0,08	0,994

Sulfonamidas = sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQ). \*Parâmetros do modelo linear  $y = ax + b$ , onde *y* é resposta cromatográfica (razão entre área da sulfonamida e área do padrão interno) e *x* é a concentração do analito (µg kg<sup>-1</sup>), *r* é o coeficiente de correlação linear.

**Tabela 2.** Resultados dos testes estatísticos para avaliação do efeito da matriz sobre a resposta cromatográfica: teste *F* e teste *t*

Analito	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub> * <sup>†</sup>	Conclusão	t <sub>calc</sub>	t <sub>tab</sub>	Conclusão
SDM	1,2	1,6	F <sub>cal</sub> < F <sub>tab</sub> (Variâncias homogêneas)	0,5	1,9	t <sub>cal</sub> < t <sub>tab</sub>
SMZ	1,1			0,01		
SQ	1,2			0,8		
STZ	1,4			1,0		

\*n = 49 observações. Sulfonamidas = sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQ).



**Tabela 3.** Repetibilidade (precisão) e recuperação (exatidão) para as sulfonamidas (sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM) e sulfaquinoxalina (SQ)) nas concentrações de 50, 100 e 150  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 

Analito	Níveis de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )					
	50		100		150	
	Recuperação (%)	Precisão (CV%)	Recuperação (%)	Precisão (CV%)	Recuperação (%)	Precisão (CV%)
SDM	86,8 $\pm$ 8,9	10,3	96,8 $\pm$ 1,9	2,0	100,6 $\pm$ 7,8	7,8
SMZ	90,4 $\pm$ 12,2	13,5	81,4 $\pm$ 9,7	11,9	89,3 $\pm$ 16,6	18,6
SQ	108,0 $\pm$ 13,9	12,9	92,5 $\pm$ 6,3	6,8	98,0 $\pm$ 9,7	10,0
STZ	75,6 $\pm$ 7,3	9,6	74,8 $\pm$ 6,1	8,2	63,2 $\pm$ 3,0	4,7

### Determinação de resíduos de sulfonamidas em amostras de camarão cultivado

Uma vez que o método foi validado, a sua aplicabilidade foi demonstrada pela análise de sulfonamidas em amostras de camarão cultivados em fazendas localizadas nos municípios de Goiana ( $7^{\circ}33'20.57''\text{S}$ ,  $34^{\circ}52'19.79''\text{W}$ ) e Rio Formoso ( $8^{\circ}38'30.02''\text{S}$ ,  $35^{\circ}5'5.47''\text{W}$ ), estado de Pernambuco, as quais foram avaliadas quanto à presença de resíduos de sulfonamidas (STZ, SMZ, SDM e SQ). Essas fazendas foram escolhidas por se saber da utilização desses antimicrobianos no processo. Os camarões foram colhidos no momento do esvaziamento dos tanques para envio às empresas de beneficiamento da região.

Seis amostras de 1 kg de camarão, de cada localidade, foram coletadas para análise de sulfonamidas. Solicitaram-se às duas fazendas que o tempo decorrido entre amostragem, envio e chegada ao laboratório fosse de até 24 h. Tal como as amostras de camarão orgânico usados na validação, essas amostras foram enviadas ao laboratório imediatamente após coleta em sacos plásticos e colocados em isopores com gelo. As amostras foram preparadas para análise no mesmo dia em que chegaram ao laboratório, de acordo com o procedimento descrito acima.

Os resultados mostraram que em 100% das amostras analisadas não foram observados níveis de sulfonamidas acima dos limites de quantificação do método. Tais resultados corroboram a boa prática de produção desenvolvida na região, respeitando-se o tempo de carência entre a administração do antimicrobiano e a comercialização dos camarões com níveis de sulfonamidas abaixo do limite estabelecido pela legislação.

Como parte complementar deste trabalho, vêm sendo conduzidos e finalizados estudos para avaliar o tempo de estocagem de amostras de camarão fortificadas com sulfonamidas, para se avaliar a estabilidade desses analitos em matriz sob temperatura de estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período de 6 meses a 1 ano.

### CONCLUSÕES

Foi otimizado um método para determinação de sulfonamidas utilizando CLAE-UV como técnica de análise, mostrando-se adequado ao uso pretendido. O método apresentou faixa de linearidade de 20-200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com índice de correlação linear ( $r$ ) maior que 0,99 e limite de quantificação para as sulfonamidas de cerca de 5-20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A extração das sulfonamidas usando acetônitrila como solvente de extração e de eluição na etapa de *clean up*, sulfato de sódio anidro como agente sequestrante de água da amostra e *clean up* com cartuchos do tipo SCX proporcionou recuperação na faixa de 63-108%. A confiabilidade do método foi avaliada a partir da análise de resíduo de sulfonamida em camarões comerciais, provenientes de fazendas de cultivo de camarão. Os resultados mostraram que, em 100% das amostras, os níveis de

sulfonamidas se apresentaram abaixo do limite de quantificação do método. Isso corrobora o comprometimento dos empreendedores da região por boas práticas de produção, oferecendo aos mercados interno e externo alimentos mais seguros, com níveis de sulfonamidas dentro dos limites estabelecidos pelas legislações vigentes.

### MATERIAL SUPLEMENTAR

A Figura 1S representa os cromatogramas para o branco da matriz (a), mistura de sulfonamidas e padrão interno em solvente (b) e matriz fortificada com sulfonamidas e padrão interno (c). A Figura 2S representa as curvas de calibração de cada sulfonamida preparada em solvente (azul) e em extrato de matriz (rosa), respectivamente. Este material está disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro, e à infraestrutura cedida pelo Laboratório de Contaminantes Químicos e Biológicos do Instituto de Tecnologia de Pernambuco pelo desenvolvimento e suporte técnico deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

- Mamani, M. C. V.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
- Gilman, G. A.; Rall, T. W.; Nies, A. S.; Taylor, P.; *Goodman & Gilman - As Bases farmacológicas da terapêutica*, 8ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.
- <http://www.abccam.com.br>, acessada em Março 2011.
- Associação Brasileira de Criadores de Camarão; *Revista da ABCC*, **2007**, n. 1, 28.
- Gräslund, S.; Holmström, K.; Wahlström, A.; *Mar. Pollut. Bull.* **2003**, *46*, 81.
- Holmström, K.; Gräslund, S.; Wahlström, A.; Pongshompoo, S.; Bengtsson, B.-E.; Kautsky, N.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2003**, *38*, 255.
- <http://www.fao.org/fishery/en>, acessada em Março 2011.
- Sapkota, A.; Sapkota, A. R.; Kucharski, M.; Burke, J.; McKenzie, S.; Walker, P.; Lawrence, R. *Environ. Int.* **2008**, *34*, 1215.
- Costa, R. A.; Vieira, G. H. F.; Silva, G. C.; Vieira, R. H. S. F.; Sampaio, S. S.; *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2008**, *45*, 458.
- Cai, Z.; Zhang, Y.; Pan, H.; Tie, X.; Ren, Y.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1200*, 144.
- Shao, B.; Dong, D.; Wu, Y.; Hu, J.; Meng, J.; Tu, X.; Xu, S.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *546*, 174.
- Dost, K.; Jones, D. C.; Davidson, G.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* **2000**, *125*, 1243.

13. Lyle-Fritch, L. P.; Romero-Beltrán, E.; Páez-Osuna, F.; *Aquacult. Eng.* **2006**, *35*, 146.
14. Kümmerer, K.; *Pharmaceuticals in the Environment - Sources, Fate, Effects and Risks*, 3<sup>rd</sup> ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2008.
15. Kishida, K.; Furusawa, N.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 2931.
16. [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/253\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/253_03rdc.htm), acessada em Março 2011.
17. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20141>, acessada em Março 2011.
18. <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=30&data=03/05/2010>, acessada em Março 2011.
19. Council regulation (EEC) no 2377/90, of 26 June 1990, Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin; *Off. J. Eur. Commun.* **1990**.
20. Lia, H.; Kijaka, P. J.; Turnipseed, S. B.; Wei, C.; *J. Chromatogr., B: Anal. Techno. Biomed. Life Sci.* **2006**, *836*, 22.
21. Potter, R. A.; Burns, B. G.; van-de-Riet, J. M.; North, D. H.; Darvesh, R.; *JAOAC Int.* **2007**, *90*, 343.
22. Pecorelli, I.; Bibi, R.; Fioroni L.; Galarini, R.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1032*, 23.
23. Kinsella, B.; O'Mahony, J.; Malonec, E.; Moloney, M.; Cantwella, H.; Fureyb, A.; Danahera, M.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 7977.
24. Leonidio, T. O.; Neves, C. C. L.; *Encontro Nacional de Química Analítica*, João Pessoa, Brasil, 2007.
25. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; *DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, 3<sup>a</sup> rev., 2010.
26. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.
27. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE 899, de 29/5/2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2/6/2003.
28. Stubbings, G.; Tarbin, J.; Cooper, A.; Sharman, M.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *547*, 262.
29. Malintan, N. T.; Mohd, M. A.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1127*, 154.
30. Fuh, M.; Chan, S.; *Talanta* **2001**, *55*, 1127.
31. Codex Alimentarius; *Límites Máximos de Resíduos para medicamentos en los alimentos*, Codex Alimentarius: Roma, 2006.