

Notas Científicas

Quantificação de sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência via azoderivados

Marcelo Volpatto Marques⁽¹⁾, Fabrício Fredo Naciuk⁽¹⁾, Ana Maria de Souza Mello⁽¹⁾,
Nair Maria Seibel⁽¹⁾, João Gabriel Rosa dos Santos⁽¹⁾ e Luiz Antonio Mazzini Fontoura⁽¹⁾

⁽¹⁾Fundação de Ciência e Tecnologia, Departamento de Engenharia de Processos, Rua Washington Luiz, nº 675, CEP 90010-460 Porto Alegre, RS. E-mail: marcelovolp@hotmail.com, naciuk@hotmail.com, ana@cientec.rs.gov.br, nair@cientec.rs.gov.br, jgabriel@cientec.rs.gov.br, mazzini@cientec.rs.gov.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar uma alternativa para a quantificação simultânea de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina no leite, na forma de azoderivados, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O isolamento e concentração das sulfas foram conduzidos por extração em fase sólida (C18), com metanol como eluente. Após a extração, os analitos foram transformados em sais de diazônio e submetidos ao acoplamento com resorcinol. Os derivados foram separados e quantificados por CLAE (coluna C8, $\lambda = 430$ nm, MeOH/KH₂PO₄ aq.). Foram obtidas recuperações entre 65 e 78%.

Termos para indexação: CLAE, extração em fase sólida, resorcinol, sais de diazônio.

Sulfonamides quantification in milk by high performance liquid chromatography via azoderivatives

Abstract – The objective of this work was to evaluate an analytical method for the simultaneous measurement of sulfathiazole, sulfamethazine, and sulfadimethoxine in milk, in the form of azoderivatives, through the high performance liquid chromatography (HPLC). The isolation and concentration of sulfas were carried out by solid phase extraction (C18) with methanol as eluent. After extraction, analytes were transformed in diazonium salts and coupled with resorcinol. Derivatives were quantified by HPLC (C8 column, $\lambda = 430$ nm, MeOH/KH₂PO₄ aq.). Recoveries were obtained between 65 and 78%.

Index terms: HPLC, solid phase extraction, resorcinol, diazonium salts.

Antibióticos são aplicados ao gado leiteiro com objetivos terapêuticos, profiláticos e para estimular o crescimento (Furusawa, 2000). O uso impróprio de antibióticos em vacas leiteiras, em particular as sulfonamidas, leva à possibilidade de ocorrer resíduos dessas substâncias no leite. As sulfas mais frequentemente administradas no gado leiteiro são sulfatiazol (1), sulfametazina (2) e sulfadimetoxina (3) (Figura 1). Segundo Anvisa (2005), o limite máximo de resíduos para o somatório dessas três sulfas no leite é de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Um método clássico de quantificação de resíduos de sulfas no leite é o apresentado pela AOAC International (Smedley, 1994), que utiliza extração líquido-líquido, e os extratos são analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método conduz a baixas recuperações de sulfatiazol e sulfametazina, além de

não permitir a quantificação simultânea das três sulfas. Feltrin et al. (2007) apresentaram o uso da extração em fase sólida (EFS) dos três antibióticos em leite com cartucho C-8, como método de isolamento, e concentração do analito e quantificação por CLAE. Embora a recuperação encontrada tenha sido adequada, nas condições de análise, ocorreu a coeluição de interferentes de modo que apenas sulfadimetoxina pôde ser quantificada.

As sulfas são substâncias anfóteras cuja solubilidade depende do pH. A quantificação desses compostos em matrizes complexas como os tecidos biológicos exige procedimentos normalmente trabalhosos de extração do analito e de separação de interferentes. A recuperação, isto é, a eficiência da operação de extração, é frequentemente baixa. Alternativas como a estratégia da derivação, entretanto, têm sido pouco utilizadas.

Uma possibilidade é o uso da fluorescamina, um reagente fluorogênico específico para aminas primárias alifáticas e aromáticas. A estratégia tem sido aplicada na quantificação de sulfas em diferentes matrizes, como carne (Stoev & Michailova, 2000), mel (Maudens et al., 2004), frango (Prosnyak et al., 2005) e leite (Alaburda et al., 2007).

Sulfas são aminas aromáticas primárias e podem, portanto, ser derivadas por meio de reações de diazotação. As reações normalmente são rápidas e os produtos coloridos são obtidos com alto rendimento (Alfare et al., 2004). A literatura descreve métodos espectrofotométricos para análise da pureza de matérias-primas ou formulados que contêm sulfas (Younis & Bashir, 1995; Nagaraja et al., 2002, 2003), mas a técnica não tem sido aplicada associada à cromatografia para a quantificação de traços. Há um relato recente apenas com reagente de Bratton-Marshall, diidrocloreto de *N*-1(naftil)etilenodiamina, como reagente de acoplamento associado à cromatografia líquida micelar (Raviolo et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma alternativa para a quantificação simultânea de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina no leite na forma de azoderivados por meio de CLAE.

A reação de derivação é mostrada na Figura 1. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent série 1100, com bomba quaternária e sistema desgaseificador, válvula injetora manual com uma alça intercambiável de 20 μL de capacidade, detector UV/vis e coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6x150 mm, 5 μm). O sistema de eluição utilizado foi MeOH 38% em KH_2PO_4 aq. 0,01 mol L^{-1} com gradiente de eluição a partir de 9 min, tendo alcançado 50% em 11 min. A vazão inicial utilizada foi de 2 mL min^{-1} , crescente até 2,5 mL min^{-1} em 4 min. A coluna foi mantida a 35°C e o detector foi ajustado para leitura a 430 nm.

Foram utilizados os seguintes reagentes: água deionizada (Milli-Q, 18 M Ω cm), KH_2PO_4 (Nuclear), acetonitrila (EM Science) e metanol (Nuclear).

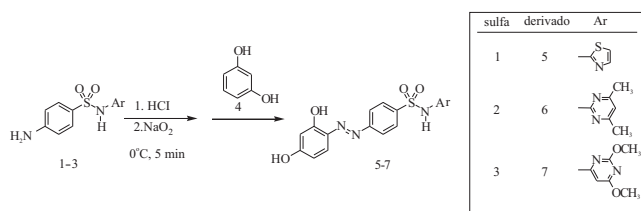


Figura 1. Formação dos compostos azóicos 5–7 derivados de sulfatiazol (1), sulfametazina (2) e sulfadimetoxina (3) por formação do sal de diazônio e acoplamento com resorcinol (4).

Os padrões utilizados foram sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina (Sigma), todos com pureza superior a 99%. Os padrões de diazoderivados foram obtidos no laboratório pelo procedimento descrito por Alfare et al. (2004). Os reagentes utilizados na reação de derivação foram os seguintes: resorcinol (Synth), nitrito de sódio (Vetec) e HCl conc. (Merck). O leite utilizado foi do tipo Integral UHT. Foram adquiridas no comércio 20 unidades de marcas ou lotes independentes, misturadas, homogeneizadas e armazenadas em congelador. A mistura foi descongelada previamente ao uso.

Para a preparação de amostras fortificadas, um volume apropriado da solução padrão, com uma mistura das três sulfas com concentrações individuais de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi medido e adicionado em 100 mL de uma amostra de leite. A mistura foi, então, homogeneizada por agitação. A extração do analito da matriz foi executada em cartuchos de EFS em fase reversa (Bond Elut C18 Varian) em dispositivo analítico com controle de pressão. A fase sólida foi condicionada pela adição de porções sucessivas de 6 mL de hexano, 6 mL de metanol e 10 mL de água. Um volume de 2 mL de amostra – leite ou leite fortificado – foi adicionado no topo do cartucho de extração, diretamente sobre a fase sólida. O cartucho foi submetido a vácuo até completa eliminação da fase aquosa. Em seguida, a fase sólida foi eluída com 2 mL de hexano, e o solvente desprezado e, posteriormente, eluída com 2x5 mL de metanol. O extrato foi seco por adição de sulfato de sódio anidro. Na seqüência, a mistura foi filtrada, e o filtrado levado ao rotavapor para eliminação do solvente (32 \pm 2°C). O extrato seco foi dissolvido em 0,3 mL de solução de 20% de HCl aq. sobre banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de NaNO_2 aq. 1%. A mistura foi mantida em agitação sobre o banho de gelo por 5 min. Em seguida, 0,5 mL de solução metanólica de resorcinol 1% foi adicionado sobre os demais reagentes. O balão foi retirado do banho de gelo e a mistura mantida em agitação à temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, o líquido contido no balão foi filtrado através da membrana de náilon e encaminhado para análise.

Para a construção da curva analítica, foram utilizadas soluções aquosas dos diazoderivados das três sulfas em sete níveis de concentração: 20, 50, 100, 150, 200, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nos três casos, a curva mostrou excelente linearidade na faixa de trabalho ($R^2 = 1,00$). Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais foram obtidos a partir da estimativa do erro-padrão fornecido

pela reta de regressão da curva analítica (Ribani et al., 2004). Os valores de LD e LQ foram *ca* 10 e 40 mg L⁻¹ para os derivados das sulfas. Os diazoderivados apresentaram coeficientes de absorvidade molar superiores às sulfas precursoras, o que confere maior sensibilidade ao método da derivação, se comparada à análise direta desses antibióticos. Além disso, o processo de preparação da amostra dobra a concentração do analito. A repetitividade na medida das áreas dos picos de cada um dos três diazoderivados, expressa como o desvio-padrão relativo (RSD), foi obtida em três níveis de concentração (50, 100 e 150 µg mL⁻¹), a partir de seis injeções consecutivas executadas por um mesmo analista (Lanças, 2004). Foram encontrados valores entre 2,8 e 9,5%.

A Figura 2 mostra os cromatogramas de uma amostra de leite e de uma amostra fortificada com 100 µg L⁻¹ de cada uma das três sulfas, submetidas à extração em fase sólida, seguidas de derivação. Observa-se a ausência de picos no cromatograma da amostra de leite, sob os picos no cromatograma da amostra fortificada. Nas condições experimentais descritas, os derivados diazossulfatiazol (5), diazossulfametazina (6) e diazossulfametoxina (7) foram eluídos com tempos de retenção de 8,3, 10,4 e 15,2 min, respectivamente. Um experimento de recuperação foi realizado com uma amostra de leite fortificada com 100 µg L⁻¹ de cada uma das três sulfas (1–3). A amostra foi extraída em cartucho Bond Elut C18 (Varian) e submetida à derivação. Foram obtidas recuperações de 74, 65 e 78% considerando-se, respectivamente, as massas adicionadas de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina na amostra fortificada.

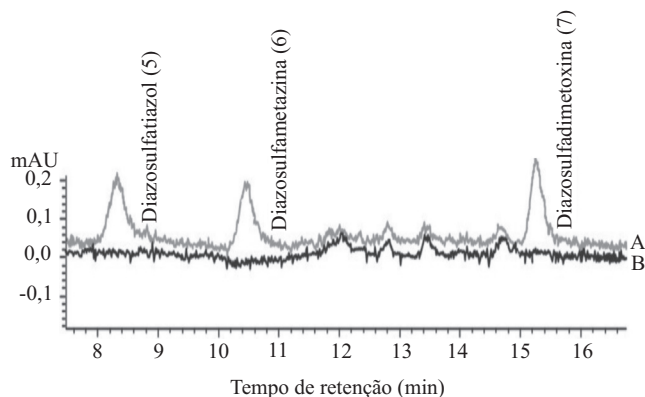


Figura 2. A, cromatograma dos derivados azóicos 5–7, obtidos por derivação do extrato de uma amostra de leite fortificada com sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina; B, cromatograma do extrato de uma amostra de leite não fortificada, submetida à derivação.

Nesta técnica, sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina foram isoladas do leite por extração em fase sólida. As sulfas extraídas foram submetidas a condições de diazotação e acoplamento com resorcinol, fornecendo compostos azóicos com recuperações de moderadas a boas. Os derivados coloridos, livres de interferentes, puderam ser quantificados por CLAE. Nas condições cromatográficas de análise, os derivados dos analitos foram eluídos com tempos de retenção inferiores a 16 min. Os limites de quantificação obtidos são adequados às exigências da legislação.

Agradecimentos

Ao Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, pelo apoio financeiro; à Fundação para o Desenvolvimento de Recursos Humanos, pela bolsa de iniciação científica.

Referências

- ANVISA. **Programa nacional de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo - PAMVet**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. 9p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2005.
- ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; SHUNDO, L.; ALMEIDA, A.P.; TIGLEA, P.; SABINO, M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1587-1592, 2007.
- ALFARE, K.; LEE, D.; SCHARRER, E.; ARMAN, A.V. Preparation of azo dyes from sulfanilamide. **Chemical Educator**, v.9, p.89-90, 2004.
- FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M.S.; SANTOS, J.G.R.; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.; FONTOURA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.30, p.80-82, 2007.
- FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimethoxine in milk. **Journal of Chromatography A**, v.898, p.185-191, 2000.
- LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Rima, 2004. 46p.
- MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.F.; LAMBERT, W.E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1047, p.85-92, 2004.
- NAGAJARA, P.; YATHIRAJAN, H.S.; RAJU, C.R.; VASANTHA, R.A.; NAGENDRA, P.; KUMAR, M.S.H. 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. **Il Farmaco**, v.58, p.1295-1300, 2003.

- NAGARAJA, P.; SUNITHA, K.R.; VASANTHA, R.A.; YATHIRAJAN, H.S. Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.53, p.187-192, 2002.
- PROSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1087, p.259-265, 2005.
- RAVIOLO, M.A.; RAMBLA ALEGRE, M.; CLAUSELL TORMOS, J.; CAPELA PEIRÓ, M.E.; CARDA BROCH, S.; ESTEVE ROMERO, J. Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.591, p.152-156, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.
- SMEDLEY, M.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.77, p.1112-1122, 1994.
- STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.871, p.37-42, 2000.
- YOUNIS, T.I.; BASHIR, W.A. Photometric assay of 1-naphthylamine by azo dye formation with diazotized sulfisomidine - application to waters. **Talanta**, v.42, p.1121-1126, 1995.

Recebido em 30 de agosto de 2008 e aprovado em 28 de novembro de 2008