

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE NITROFURAZONA, FURAZOLIDONA E NICARBAZINA EM TECIDOS DE ORIGEM ANIMAL¹

Scheilla V. C. SOUZA^{2,*}, Gilsara SILVA², Maria Helena G. M. DINIZ²,

Eleonora V. SANTOS², Josefa A. LIMA², João C. TEODORO²

RESUMO

Foi padronizado e validado um método analítico para determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em tecido muscular empregando-se extração com acetonitrila, purificação com cartuchos de sílica e C₁₈ e detecção e quantificação por CLAE/UV. Nos ensaios com amostras fortificadas entre 5 e 200mg/kg as recuperações médias obtidas variaram de 73,6 a 95,6% com valores de C.V. entre 4,8 e 26,4%. O limite de detecção e quantificação do método foi de 5mg/kg, para cada um dos três resíduos estudados.

Palavras-chave: nitrofurazona; furazolidona; nicarbazina; resíduos; tecido animal; cromatografia.

SUMMARY

DETERMINATION OF NITROFURAZONE, FURAZOLIDONE AND NICARBAZIN RESIDUES IN ANIMAL TISSUES. A method for determination of nitrofurazone, furazolidone and nicarbazin residues in muscle tissues was standardized and validated using acetonitrile extraction, clean-up with silica and C₁₈ cartridges and detection and quantification by HPLC/UV. In the assays using spiked samples in levels varying from 5 to 200mg/kg the average recovery values ranged from 73.6 to 95.6% with C.V. values between 4.8 and 26.4%. The limits of detection and quantification of this method was 5mg/kg for each studied residue.

keywords: nitrofurazone; furazolidone; nicarbazin; residues; tissue; chromatography; juice; sodium metabisulfite; nitrogen; shelf life.

1 – INTRODUÇÃO

A furazolidona e a nitrofurazona são antimicrobianos sintéticos, de amplo espectro, com atividade antiprotozoária, pertencentes a um grupo de compostos denominados nitrofuranos [1, 2]. Estes são utilizados em avicultura e suinocultura no controle de salmonelose, colibacilose e coccidiose [3, 4, 5]. São também empregados como aditivos não nutricionais em rações, para promoção de crescimento e aumento da eficiência alimentar [3, 5].

Apresentam efeitos mutagênicos, carcinogênicos [3] e possibilidade de reações de hipersensibilidade em indivíduos sensíveis, sendo necessário uma rigorosa regulamentação do seu uso em animais destinados a produção de alimentos. No Brasil, foram estabelecidos para estes compostos limites de tolerância zero, em músculo de frango, sendo proibida sua utilização em

animais produtores de alimentos [4]. O MERCOSUL propôs uma regulamentação para estas drogas que também estabelece limites máximos de resíduo zero [6]. A proibição da utilização destes compostos em animais destinados à alimentação humana vinculou a legislação à sensibilidade dos métodos analíticos adotados pelos organismos oficiais de regulamentação.

A nicarbazina é um coccidiostático empregado na avicultura, também utilizado como promotor de crescimento. Dissocia-se rapidamente *in vivo* em dois componentes: o 4-4-dinitrocarbanilida (DNC) e 2-hidroxi 4,6-dimetil 2-pirimidinol (HDP) [2]. O componente HDP apresenta uma biotransformação mais rápida que o DNC, sendo excretado na urina (95%), enquanto o DNC é eliminado, sobretudo, nas fezes [7]. Desta forma, o problema de resíduos de nicarbazina em alimentos de origem animal é representado praticamente pelo componente DNC, o qual persiste mais tempo no organismo do animal que o HPD [8].

Durante o processo de cozimento de carnes contendo resíduos de DNC ocorre a formação de derivados com atividade carcinogênica. Existem também relatos de efeitos crônicos em estudos com animais (ratos e cães que apresentaram NOEL de 50 e 60mg DNC/kg de peso corporal, respectivamente) [8]. Enquanto os limites e intervalos de segurança para nicarbazina em músculo de frango estão sendo ultimados pelo CODEX ALIMENTARIUS FAO/WHO, como uma prioridade, o Brasil adotou o limite máximo de resíduo de 200mg/kg [4].

Métodos analíticos para determinação de nitrofuranos e nicarbazina que empregam extração com solventes como acetato de etila [5, 9], acetonitrila [1] ou dimetilformamida [10, 11], seguida de purificação por extração em fase sólida [1, 5, 9, 11] e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de ultra-violeta (UV) [1, 5, 9, 11, 12], têm sido amplamente utilizados e recomendados por organismos oficiais de regulamentação [4, 13].

Independente da técnica utilizada, o controle de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em alimentos requer métodos eficientes, principalmente no que diz respeito à sensibilidade, visando garantir a confiabilidade dos dados relativos à incidência de resíduos destes compostos, que subsidiam a formulação de políticas de saúde pública e adequação do país, do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos.

Este trabalho objetivou padronizar e validar um método multiresíduo [14,15,16], para determinação de

¹ Recebido para publicação em 04/02/00. Aceito para publicação em 18/04/01.

² Setor de Cromatografia, Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MG), Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MA), Tel. (31) 36613000, Fax (31) 36612383, e-mail labmg@yahoo.com.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina (fração DNC) em músculo por CLAE/UV, baseado nos descritos por NAGATA & SAEKI [14], ESPANHA [15] e TARBIN & SHEARER [16], a ser adotado nas atividades de monitoramento do Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/MG para o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB) do Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Padrões

Os padrões de nitrofurazona e furazolidona empregados foram da marca Sigma (St. Louis, MO). Para nicarbazina foi utilizado um produto comercial com 99% de pureza. As soluções estoques de nitrofurazona e furazolidona foram preparadas utilizando acetonitrila enquanto a solução estoque de nicarbazina foi preparada com dimetilformamida. Nas soluções intermediárias e de fortificação dos três resíduos foi utilizada acetonitrila. Posteriormente, as soluções foram devidamente acondicionadas, identificadas e armazenadas, sob temperatura de congelamento, devidamente protegidas da luz e vedadas, até o momento da análise.

2.2 - Amostras

Foram utilizadas amostras de músculo de aves, previamente analisadas por outro método, já validado, e com resultados não detectados para nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina. As amostras foram fortificadas por adição de solução padrão das substâncias pesquisadas.

2.3 – Procedimentos analíticos

2.3.1 – Extração

Os resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina foram extraídos de 10g de amostra com 15mL de acetonitrila, após centrifugação a 2500rpm, por 5 minutos, a -20°C e filtração do extrato através de sulfato de sódio anidro (cerca de 20g).

2.3.2 – Purificação

O extrato foi primeiramente purificado por partição líquido:líquido utilizando 3 porções de 10mL de hexano. A fase de acetonitrila foi evaporada e o resíduo dissolvido em 1mL de metanol, o qual foi aplicado em cartucho de sílica Waters de 6 mL/500mg. Os resíduos foram eluídos com 6mL de acetato de etila. Em seguida, o extrato purificado foi evaporado a cerca de 1mL e aplicado em um cartucho de C₁₈ Waters de 6mL/500mg (previamente ativado com 4mL de metanol e 4mL de acetato de etila). Os resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina foram novamente eluídos com 4mL acetato de etila.

2.3.3 – Separação, detecção e quantificação

Os extratos purificados foram evaporados, solubilizados em 1mL de acetonitrila:ácido acético a 1%

(50:50; v/v), filtrados em membrana Millipore de 0,45mm e analisados por CLAE (sistema de bomba quaternário, degaseificador de membrana, injetor automático e detector UV Termo Separation Products; aquisição, controle e processamento de dados por microcomputador IBM), sob as seguintes condições:

- detector ultra violeta, 360nm;
- coluna Lichrosorb C₁₈, 5mm, 250 x 4,6mm;
- tempo de separação de 8 minutos;
- fase móvel acetonitrila:ácido acético a 1%, em gradiente (tempo zero acetonitrila:ácido acético a 1% (50:50, v/v) e em 8 minutos acetonitrila a 100%);
- fluxo de 1mL/min;
- volume de injeção de 20mL.

2.4 – Procedimentos de validação

2.4.1 – Ensaios com padrões

Foram realizados ensaios com soluções padrões (*pools*) para determinação da linearidade sem interferência da matriz e do limite de detecção do equipamento [17,18]. As soluções empregadas foram de 0; 0,391; 0,781; 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800ng/mL.

2.4.2 – Ensaios com amostras fortificadas

Os níveis de contaminação avaliados nos ensaios com amostras fortificadas, em pelo menos cinco repetições, foram 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 200mg/kg. A cada grupo de amostras fortificadas destinado à análise foi incluída uma amostra branca para confirmação da não detecção dos resíduos pesquisados.

Nestes ensaios foram avaliados linearidade com interferência da matriz, especificidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação do método [17,18].

2.4.3 – Valores de referência

Foram adotados como referência para avaliação da exatidão e precisão os valores estabelecidos como aceitáveis pelo CODEX [19] e internalizadas pelo MERCOSUL [20] para métodos quantitativos (*Tabela 1*).

TABELA 1. Níveis de contaminação e respectivos valores de recuperação e coeficiente de variação aceitáveis para resultados quantitativos

Concentração (µg/kg ou L)	Exatidão	Precisão
	Recuperação (%)	Coeficiente de variação intralaboratorial (%)
≤ 1	50 a 120	35
1 a 10	60 a 120	30
10 a 100	70 a 110	20
> 100	80 a 110	15

Fonte: CODEX [19], MERCOSUL [20].

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios com soluções padrões (0; 0,391; 0,781; 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800ng/mL), foi demonstrada linearidade da resposta na faixa de 800 a 3,125ng/mL, com coeficientes de correlação superiores a 0,9997, conforme ilustrado na *Figura 1*. Não foi registrado pico de nicarbazina para a solução de 1,563ng/mL e nenhum dos três compostos foram detectados nas soluções de 0,391 e 0,781ng/mL.

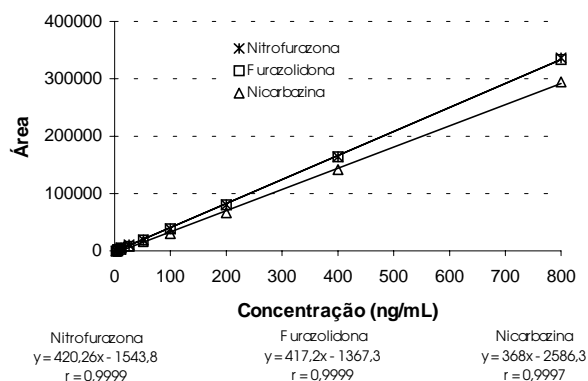


FIGURA 1. Curvas de calibração, equações e coeficientes de correlação obtidos nos ensaios de linearidade com soluções padrões - integração por área.

O limite de detecção do equipamento, determinado como a menor massa da substância detectada, nas condições estabelecidas pelo método, com sinal, no mínimo, três vezes o valor do maior sinal de ruído no cromatograma [17,18], foi de 0,125ng, para cada um dos três resíduos, correspondente à massa injetada em 20mL da solução de 6,25ng/mL.

Especificidade e linearidade da resposta, considerando-se a interferência da matriz, foram observadas nos ensaios utilizando amostras fortificadas. Os picos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina apresentaram resolução satisfatória, separados dos picos de interferentes. Houve concordância entre os tempos de retenção dos três compostos pesquisados nos cromatogramas obtidos para soluções padrões e amostras (*Figura 2*).

As porcentagens de recuperação médias e coeficientes de variação obtidos nos ensaios com amostras fortificadas, para cada nível estudado, estão descritos na *Tabela 2*. Foi verificada exatidão e precisão dentro dos intervalos descritos como aceitáveis (*Tabela 1*) [19,20] para os níveis 5; 10; 20; 40; 80 e 200mg/kg. Nesta faixa os valores médios de porcentagem de recuperação e coeficientes de variação apresentaram-se entre 73,6 a 95,6% e 4,8 e 26,4%, respectivamente. Os resíduos pesquisados não foram detectados em todas as amostras fortificadas com 2,5 mg/kg. Neste nível de fortificação não foram contemplados os valores estabelecidos como aceitáveis (*Tabela 1*) [19,20]. Portanto, o nível 5mg/kg foi estabelecido como limite de detecção e quantificação do método.

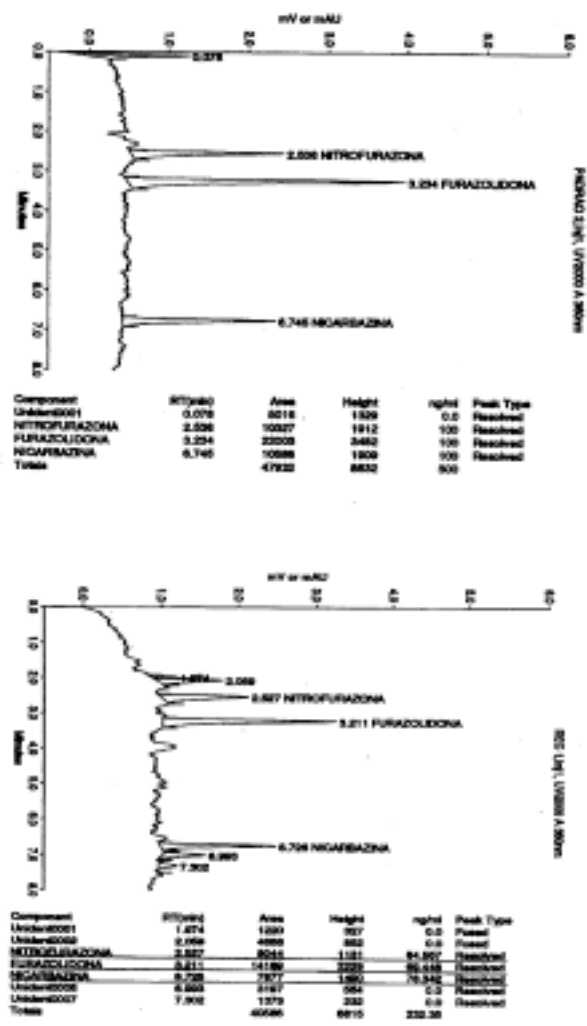


FIGURA 2. Cromatogramas obtidos para solução padrão (100ng/mL) e amostra fortificada (10mg/kg).

TABELA 2. Valores médios de porcentagem de recuperação e coeficientes de variação obtidos para nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina por nível de fortificação estudado

Fortificação (µg/kg)	n	Nitrofurazona		Furazolidona		Nicarbazina	
		Rm (%)	C.V. (%)	Rm (%)	C.V. (%)	Rm (%)	C.V. (%)
200	6	91,2	10,2	90,0	14,6	95,6	12,9
80	5	85,1	12,3	91,3	12,2	85,9	9,0
40	6	91,3	11,0	92,0	4,8	78,3	8,4
20	6	94,5	13,9	93,5	8,8	84,2	16,5
10	8	89,5	16,8	85,6	17,6	88,6	14,6
5	10	78,7	20,1	80,2	26,4	73,6	20,6
2,5	10	44,5	94,2	90,1	47,7	40,2	124,5

Rm = recuperação média.
 CV = coeficiente de variação.
 n = número de replicatas.

Os valores individuais de porcentagem de recuperação obtidos para a faixa de linearidade do método (5

a 200mg/kg) estão demonstrados na *Figura 3*. Pode-se observar que a dispersão entre os valores de porcentagem de recuperação, em um mesmo nível de fortificação, apresenta-se maior quanto menor o nível de fortificação estudado. Entretanto, em todos os casos os valores apresentaram-se dentro dos intervalos estabelecidos pelo CODEX [19] e MERCOSUL [20] (*Tabela 1*).

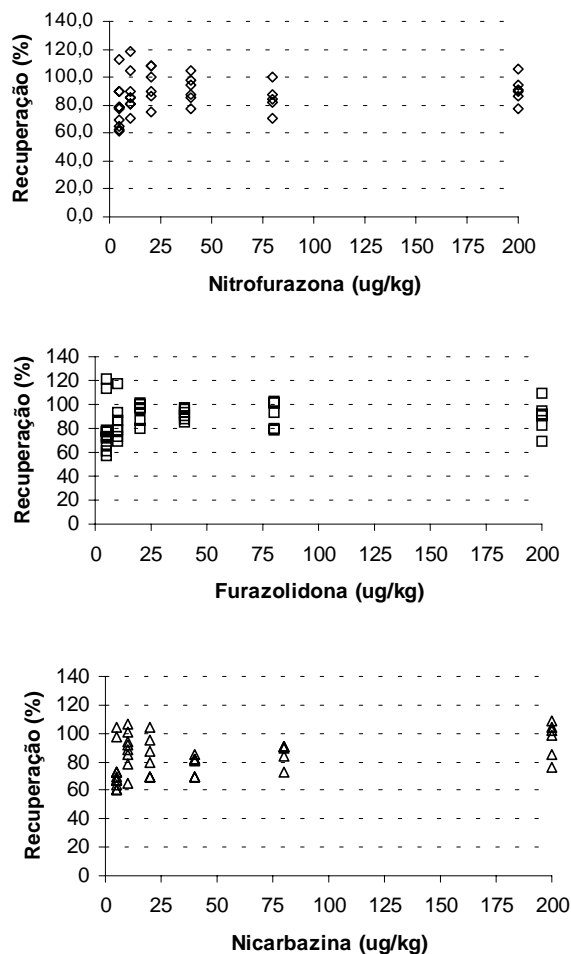


FIGURA 3. Valores individuais de porcentagem de recuperação obtidos para nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em ensaios com amostras fortificadas.

Foram considerados como pontos críticos do método o peso da amostra, o volume final de retomada do extrato purificado, o fluxo de eluição nos cartuchos, proteção quanto à exposição de luz direta e relação tempo/temperatura de evaporação.

4 – CONCLUSÕES

O método padronizado e validado mostrou-se eficiente em termos de linearidade, especificidade, sensibilidade, exatidão e precisão, além de possuir limites de detecção e quantificação suficientemente baixos para ser adotado nas atividades de monitoramento de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em músculo.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RUPP, H. S.; MUNNS, R. K.; LONG, A. R. Simultaneous determination of nitrofurazone and furazolidone in shrimp (*Penaeus vannamei*) muscle tissue by liquid chromatography with UV detection. *J. of AOAC Int.*, v. 76, p. 1235-1239, 1993.
- [2] WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; BLUMETTI, R. F.; OTTERBEIN, E. S. (Ed.). **The index MERCK**. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Rahway: MERCK & CO., Inc., 1983. 1463 p.
- [3] YNDESTAD, M. **Public health aspects of residues in animal products: fundamental considerations**. Norway: Department of Food Hygiene, Norwegian College of Veterinary Medicine. 1990.
- [4] DOU – Diário Oficial da União. Brasília, 17 fev. 1999. **Instrução normativa 3**. Seção 1, p.15-33.
- [5] KUMAR, L.; TOOTHILL J.R.; HO K. Determination of nitrofurazone residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid chromatography. *J. of AOAC Int.*, v. 77, p. 591-595, 1994.
- [6] MERCOSUL - Mercado Comum do Cone Sul. Regulamento técnico. **Metodologias analíticas, ingestão diária admissível y limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários en alimentos de origem animal**. Resolução s/ no /99, II Reunión Ordinaria, SGT no 3, Acta 2/99. 1999. (Publicação avulsa).
- [7] Sadia - **Nicarbazina seu uso em frangos de corte e resíduo da droga na carcaça**. Concórdia: Núcleo de nutrição Animal Sadia. [s.n]. 1992. (Reunião técnica).
- [8] VALFRE, F.; MORETTI, V. M. Nicarbazina: impiego nell'alimentazione dei broilers e valutazione dei residui. *Obiettivo Veterinari*, n. 10, p. 11-15, 1990.
- [9] USDA - United States Department of Agriculture. **Analytical chemistry laboratory guidebook residue chemistry**. Washington: USDA. [s.n.], 1991. (paginação irregular).
- [10] PARKS, O. W.; KUBENA, L. F. Liquid chromatography-electrochemical detection of furazolidone and metabolite in extracts of incurred tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 73, p. 526-528, 1990.
- [11] AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15. Ed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1, p. 99-101.
- [12] LONG, A. R.; HSIEH, L. C.; MALBROUGH, M. S.; SHORT, C. R.; BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of furazolidone in pork muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 74, p. 292-294, 1991.
- [13] CODEX ALIMENTARIUS. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Fifty-second meeting. Rome. 1999.
- [14] NAGATA, T.; SAEKI, M. Simultaneous determination of 17 antibacterials in chicken tissues by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, n. 29, v. 1, p. 13-20, 1988.
- [15] ESPANHA Ministério de Sanidad y Consumo. **Metodos de analisis de residuos en alimentos**. Majadahonda: Instituto de Salud Carlos III. 1989. Paginação irregular.
- [16] TARBIN, J. A.; SHEARER, G. High performance liquid chromatographic method for the determination of the dinitrocarbanilide component of nicarbazin in eggs with on-line clean-up. *J. Chromatogr.*, v. 613, p. 354-358, 1993.
- [17] EURACHEM / WELAC Chemistry Working Group. EURACHEM. Guidance document no 1. WELAC Guidance document no WGD2. **Accreditation for chemical laboratories. Guidance on the interpretation of the**

EN 45000 series of standards and ISO/IEC Guide 25. ed. 1. 1993. 34 p.

[18] CITAC Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry. CITAC Guide 1. **International guide to quality in analytical chemistry. An aid to accreditation.** ed. 1. 1995. 51 p.

[19] CODEX ALIMENTARIUS. Volume 3. **Resíduos de medicamentos veterinarios en los alimentos.** 2 ed. Roma. 1993.

[20] MERCOSUL Mercado Comum do Cone Sul. **Crítérios para a validação de metodologias analíticas para determinação de resíduos de princípios ativos de medicamentos veterinários (RMV) em produtos de origem animal.** Resolução 57/94, [s.n.l.], 1994.