



DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR LC-MS/MS PARA CONTROLE DE ANTIPARASITÁRIOS EM LEITE.

Bruna Suellen Alves **Ramos**¹, Regina Prado Zanes **Furlani**², Fernanda Moralez Leme **Gomes**³,
Sílvia Amélia Verdiani **Tfouni**⁴, Daniela **Daniel**⁵.

Nº 14227

RESUMO – A presença de resíduos de medicamentos veterinários em diferentes alimentos de origem animal tem sido largamente estudada e a adoção de regulamentações cada vez mais rígidas em relação aos limites máximos permitidos tem sido uma constante. Desta forma, o monitoramento da presença destes compostos tem papel de destaque no controle de qualidade de alimentos e por esse motivo surge a necessidade da implantação de métodos capazes de detectar esses compostos em níveis cada vez menores. O objetivo do presente estudo foi adequar e validar metodologia para análise simultânea de 6 compostos com atividade antiparasitária: ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina, moxidectina e diflubenzurom que são utilizados em gado para o controle de parasitas. Utilizou-se o método QuEChERS (do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) de preparo de amostra com identificação e quantificação por LC-MS/MS. Os limites de quantificação (LOQ) foram menores do que $2,5 \mu\text{gL}^{-1}$, para todos os compostos, a recuperação variou entre 75 e 122 % com coeficientes de variação inferiores a 8%. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o método validado é adequado para a análise dos compostos estudados, podendo assim ser aplicado em monitoramentos dessas substâncias em leites.

Palavras-chaves: leite, medicamentos veterinários, atividade antiparasitária.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia. de Alimentos, UNIMEP, Sta. Barbara D'Oeste-SP; b.sramos@yahoo.com.br.

2 Orientadora: ITAL/CCQA, Campinas-SP; rfurlani@ital.sp.gov.br.

3 Colaborador: Assistente, ITAL/CCQA, Campinas-SP.

4 Colaborador: Pesquisador, ITAL/CCQA, Campinas-SP.

5 Colaborador: Pesquisador, Agilent Technologies, São Paulo-SP.



ABSTRACT - *The presence of residues of veterinary drugs in different animal foods has been widely studied and the adoption of increasingly stringent regulations relating to permitted ceilings has been a constant. Thus, monitoring the presence of these compounds has an important role in quality control of food and therefore need arises deployment methods capable of detecting these compounds at levels smaller and smaller. The aim of this study was to adapt and validate methodology for simultaneous analysis of compounds 6 with antiparasitic activity (ivermectin, abamectin, doramectin, eprinomectin, moxidectin and diflubenzuron) that are used in cattle for the control of parasites. We used the QuEChERS method for sample preparation and identification and quantification by LC-MS/MS. The limits of quantification (LOQ) were less than 2.5 mgL⁻¹ for all compounds, recovery ranged from 75 to 122 %, and RSD was less than 8%. Therefore, according to the results obtained the method is suitable for the analysis of the compounds studied, and thus can be applied to monitoring these substances in milk.*

Key-words: milk, veterinary drugs, antiparasitic activity.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a produção mundial de leite aumentou em mais de 50%, passou de 470 milhões de toneladas em 1981 para 727 milhões de toneladas em 2011. A Índia é o maior produtor de leite do mundo, com 16% da produção mundial, seguida pelos Estados Unidos da América, China, Paquistão e Brasil, que produziu 32 milhões de toneladas de leite em 2011 (FAO, 2014; Embrapa, 2014).

Vários benefícios são associados ao consumo de leite. Hipócrates já dizia: “o leite é um alimento muito próximo da perfeição”. Ele é considerado uma grande fonte de nutrientes e o seu consumo pode contribuir com a ingestão recomendada de proteínas, gordura, fósforo, cálcio, dentre outros minerais, vitaminas do complexo B, vitaminas A e C. No entanto, se não for obtido dentro de boas práticas veterinárias, o leite pode ser veículo de contaminantes.

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em diferentes alimentos de origem animal tem sido largamente estudada e a adoção de regulamentações cada vez mais rígidas em relação aos limites máximos permitidos tem sido uma constante. Desta forma, o monitoramento da presença destes compostos tem papel de destaque no controle de qualidade de alimentos e por



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

esse motivo surge a necessidade da implantação de métodos capazes de detectar esses compostos em níveis cada vez menores.

Com o objetivo de proteger o consumidor e garantir práticas justas no comércio, a presença dessas substâncias em alimentos é monitorada por agências regulamentadoras utilizando Limites Máximos de Resíduos (LMR). O Codex Alimentarius não estabelece LMR para moxidectina (MOX) em leite, mas adota LMR de $5 \mu\text{gL}^{-1}$, $10 \mu\text{gL}^{-1}$, $15 \mu\text{gL}^{-1}$ para abamectina (ABA), ivermectina (IVE), doramectina (DOR), respectivamente. Para eprinomectina (EPR) e diflubenzurom (DFB) o LMR é $20 \mu\text{gL}^{-1}$. No Brasil, os resíduos de medicamentos veterinários são monitorados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), tomando como base os LMR sugeridos pelo CODEX, Food and Drug Administration (FDA) e União Européia (UE). Para o PNCRC, os LMR para abamectina, ivermectina e moxidectina em leite foram estabelecidos como $10 \mu\text{gL}^{-1}$. Para doramectina e eprinomectina, o LMR foi definido como $15 \mu\text{gL}^{-1}$ e $20 \mu\text{gL}^{-1}$, respectivamente. Não há um valor estabelecido para o diflubenzurom.

A implantação de metodologias eficientes e validadas para análise resíduos em leite é de grande importância para que se possa garantir a qualidade e segurança alimentar. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi adequar e validar metodologia para análise simultânea de 6 compostos (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina, moxidectina e diflubenzurom) que podem ser utilizados em gado para o controle de parasitas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras e Reagentes

Foi utilizado nos ensaios para a validação de metodologia leite orgânico integral pasteurizado. Os padrões utilizados de DOR, IVE, MOX, ABA, EPR e DFB foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich/ Fluka, todos com pureza superior a 95%. A solução estoque dos padrões foi preparada em acetonitrila na concentração de 10mgL^{-1} levando-se em consideração a pureza. A partir destas foram preparados novas soluções diluídas contendo os seis padrões. Os sais e solventes de uso comum em laboratório foram de grau analítico e os solventes utilizados foram de grau cromatográfico. O sorbente PSA (amina primária secundária) foi adquirido da empresa Varian®.



2.2 Metodologia analítica

A metodologia para extração e limpeza dos compostos foi baseada na metodologia QuEChERS (do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) descrita por Anastassiades et al (2003) e Kinsella et al (2009).

Foram adicionados 10 mL da amostra de leite orgânico em um tubo de centrífuga de 50 mL, então adicionou-se 10 mL de acetonitrila e agitou-se no vórtex. Acrescentou-se 4 g de MgSO₄ anidro e 1 g de NaCl, agitou-se por aproximadamente 1 minuto e centrifugou-se por 2 minutos a 2500 rpm. Uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga de 25 mL contendo PSA e MgSO₄ anidro. O tubo foi agitado em vórtex por 30 segundos e centrifugado por 2 minutos a 2500 rpm. Em seguida filtrou-se o sobrenadante obtido em membrana de 0,45 µm. Após filtrar, o extrato foi injetado no cromatógrafo.

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Agilent acoplado a detector de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) em modo ESI Eletrospray positivo. O cromatógrafo foi controlado pelo “software MassHunter” para administração do sistema de aquisição e tratamento de dados. A coluna analítica utilizada foi a de fase estacionária de octadecilsilil (C18) Agilent ZORBAX Eclipse Plus (2,1 x 50 mm, 1,8 µm) mantida em forno com temperatura controlada de 40°C. O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel consistiu em gradiente de formato de amônia (20 mM) e acetonitrila. O fluxo foi de 0,3 mLmin⁻¹. Na tabela 1 está apresentado o gradiente utilizado.

Tabela 1. Gradiente da fase móvel para a separação dos antiparasitários.

Tempo (minuto)	Formato de amônia 20 mM (%)	Acetonitrila (%)
0	30	70
4	10	90
6	10	90
6,01	30	70

Foram adicionados 10 mL da amostra de leite orgânico em um tubo de centrífuga de 50 mL, então adicionou-se 10 mL de acetonitrila e agitou-se no vórtex. Acrescentou-se 4 g de MgSO₄ anidro e 1 g de NaCl, agitou-se por aproximadamente 1 minuto e centrifugou-se por 2 minutos a 2500 rpm. Uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga de 25 mL contendo 100 mg de PSA e 300 mg de MgSO₄ anidro. O tubo foi agitado em vórtex por 30 segundos e centrifugado por 2 minutos a 2500 rpm. Em seguida filtrou-se o sobrenadante obtido em membrana de 0,45 µm e injetou-se no LC-MS/MS.



2.3 Validação da metodologia

Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade na matriz, exatidão, precisão (repetitividade), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Para a linearidade, os níveis estudados para os compostos ABA, DOR, IVE e EPR foram 1, 3, 5, 7, 10, 20 e 30 μgL^{-1} , para o composto MOX os níveis foram 5, 15, 25, 35, 50, 100 e 150 μgL^{-1} e para o composto DFB os níveis foram 10, 50, 75, 100 e 150 μgL^{-1} . A linearidade do método foi avaliada a partir da equação da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados ordinários. O coeficiente de correlação linear (r) foi usado como parâmetro para avaliar a adequação da reta como modelo matemático.

A exatidão do método foi avaliada através de estudos de recuperação em 5 replicatas independentes em 3 níveis de fortificação. Os níveis estudados foram 1, 5 e 10 μgL^{-1} para ABA, DOR, IVE e EPR, 5, 25 e 50 μgL^{-1} para MOX e 10, 15 e 20 μgL^{-1} para DFB.

A precisão sob condição de repetitividade foi avaliada através de seis ensaios de recuperação, realizados em dias diferentes, em amostra de leite orgânico no nível de 5 μgL^{-1} para ABA, DOR, IVE e EPR, 25 μgL^{-1} para MOX e 15 μgL^{-1} para DFB. A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação associados as medições obtidas durante os testes de recuperação.

Os limites de detecção foram calculados segundo INMETRO (2011). Foram analisadas 7 amostras de leite orgânico fortificadas com padrão dos compostos estudados (1 μgL^{-1} para ABA, DOR, IVE e EPR, 5 μgL^{-1} para MOX e 10 μgL^{-1} para DFB). O desvio padrão das concentrações obtidas foi multiplicado por 3,143 (valor de t da tabela de Student para 7-1 graus de liberdade) para obtenção do LOD e por 10 para obtenção do LOQ.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os parâmetros de regressão foram estimados pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários. Os resultados indicam que as curvas de calibração nos extratos da matriz são consideradas apropriadas para uso uma vez que os coeficientes de correlação linear (r) ficaram maiores que o estabelecido de 0,98 (ANVISA, 2003), indicando uma linearidade aceitável.

Os valores médios de recuperação ficaram entre 75 e 122% e estão dentro de um intervalo considerado aceitável para análise de resíduos, demonstrando uma exatidão adequada. Os coeficientes de variação (CV) ficaram entre 0,3 e 8 %, evidenciando boa precisão, uma vez que os CV de até 20% são aceitáveis em análise de resíduos (Brasil, 2009).



Os LOD e LOQ variaram de 0,08 a 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,3 a 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Esses limites são considerados satisfatórios, uma vez que são menores que os LMR estabelecidos pelo CODEX ALIMENTARIUS e MAPA.

Os resultados da validação da metodologia estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados das recuperações, coeficientes de variação, limites de detecção, limites de quantificação obtidos na validação da metodologia e limites máximos de resíduos.

Antiparasitário	r	Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	CV (%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LMR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
							Codex	MAPA
Diflubenzurom	0,9984	10	104	0,3	0,8	2,5	20	-
		15	101	1				
		20	87	1				
Eprinomectina	0,9984	1	122	7	0,08	0,3	20	20
		5	86	4				
		10	75	4				
Abamectina	0,9963	1	116	3	0,2	0,7	5	10
		5	98	4				
		10	95	2				
Doramectina	0,9971	1	94	5	0,1	0,4	15	15
		5	99	2				
		10	102	8				
Moximectina	0,9944	5	100	6	0,6	1,9	-	10
		25	97	3				
		50	94	7				
Ivermectina	0,9974	1	102	2	0,1	0,4	10	10
		5	102	6				
		10	98	2				

r: coeficiente de correlação linear; R (%): Recuperação média (n=5); CV%: Coeficiente de variação (n=5); LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de Quantificação; LMR: Limite Máximo de Resíduo.

Furlani e colaboradores (2014) validaram um procedimento para análise de 5 macrolactonas em leite e iogurte (DOR, IVE, MOX, ABA e EPR) utilizando QuEChERS com reação de derivatização e cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Os LOQ que os autores obtiveram para ABA (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) e MOX (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram menores que os obtidos nesse estudo e para as outras macrolactonas os LOQ foram maiores (EPRI: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, DOR: 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e IVE: 5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Apesar de a técnica por fluorescência ser sensível o suficiente para detectar esses compostos em níveis menores que os LMR estabelecidos, a metodologia é demorada devido à reação de derivatização (30 min.) e o tempo da corrida cromatográfica (15 min.). A técnica validada nesse estudo apresenta valores de LOQ apropriados, linearidade, exatidão e precisão adequadas e o tempo total de análise é pequeno, ao redor de 20 minutos.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Os dados obtidos durante a validação da metodologia demonstram que o procedimento QuEChERS para preparo de amostra com detecção e quantificação por LC-MS/MS é satisfatório para a análise dos seis compostos estudados. A metodologia é rápida, simples além de utilizar pouco solvente e pode ser uma opção para análise de antiparasitários em leite para o controle de qualidade na indústria de laticínios e laboratórios oficiais.

4 CONCLUSÃO

O método proposto é rápido, simples de ser executado, utiliza pouco solvente e vidraria além de ter sensibilidade adequada para atender aos limites máximos de resíduos estabelecidos pela maioria dos países.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBIC, pela bolsa concedida. À Agilent Technologies. Ao CCQA - ITAL, pela oportunidade da elaboração do projeto e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, v.86, p.412-431, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento *Instrução Normativa nº 42* de 20 de dezembro de 1999. Alterar o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 de dezembro de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 24*, de 14 de julho de 2009. Diário Oficial da União, 22 de julho de 2009.

CODEX ALIMENTARIUS. Pesticide Residues in Food. 2010. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp>. Acesso em: 15 de Mai. 2014.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2014). Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php>>. Acesso em: 26 de Fev. 2014.

European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Comm, L 221, p. 8-36.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014). Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.Uw8_zfldXQg>. Acesso em: 26 de Fev. 2014.

FURLANI, R. P. Z.; DIAS, F.F.G.; NOGUEIRA, P.M.; GOMES, F. M. L.; TFOUNI, S.A.V.; CAMARGO, M.C.R. et al., Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. **Food Control**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351400187X>>. Acesso em: 24 de Abr. 2014.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, revisão 04, 2011.

KINSELLA B, LEHOTAY SJ, MASTOVSKA K, LIGHTFIELD AR, FUREY A, Danaher M. New Method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 637, nº 1-2, p. 196-207, 2009.