

MACROLACTONAS EM IOGURTE

PATRÍCIA M. **NOGUEIRA**¹; REGINA P. Z. **FURLANI**²; FERNANDA M. L. **GOMES**³;
MONICA C. R. **CAMARGO**⁴; SILVIA A. V. **TFOUNI**⁵

Nº 12241

RESUMO

As avermectinas e milbemicinas são substâncias pertencentes à família das macrolactonas (ML) e são amplamente utilizadas como medicamentos antiparasitários em animais e humanos. No Brasil, existem cinco compostos registrados para utilização em bovinos (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e moxidectina). Embora a utilização dessas substâncias traga benefícios ao rebanho a utilização indiscriminada dos medicamentos pode resultar em resíduos nos alimentos. Neste contexto, esse estudo teve como objetivo a validação de metodologia multirresíduos (QuEChERS) para as cinco ML comercializadas no Brasil em iogurte. O método consistiu em extração com acetonitrila, partição líquido-líquido com adição de MgSO₄ e NaCl seguida de extração em fase sólida dispersiva com MgSO₄ e PSA. O extrato foi derivatizado para a determinação das ML por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência. O método foi validado com estudos de recuperação em iogurte orgânico nos níveis 0,0025, 0,010 e 0,020 mg/kg e a média de recuperação variou de 88 a 109%, com coeficientes de variação menores que 14%. O método apresentou boa linearidade e limites de detecção (LD) que variaram de 0,0012 a 0,0017 mg/kg. O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido pelo menor nível de fortificação onde se obteve exatidão adequada, ou seja, 0,0025 mg/kg. Não foram encontrados resíduos nas 104 amostras analisadas (>LQ).

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. De Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, pati.mnogueira@gmail.com.br.

² Orientadora: CCQA/ITAL, Campinas-SP.

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

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

⁵ Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

ABSTRACT

The avermectins and milbemycins belong to a family of compounds called macrocyclic lactones (ML) and are highly used as anti-parasitic agents in humans and animals. In Brazil, there are five substances registered for bovines (ivermectin, abamectin, doramectin, eprinomectin e moxidectin). Although the use of these substances can bring benefits to the cattle, when used indiscriminately, it can result in residues in food. In this context, this study intended to validate an analytical method for analysis of five ML in yogurt using QuEChERS sample preparation. The method involved extraction with acetonitrile, liquid-liquid partition with addition of $MgSO_4$ and $NaCl$, dispersive SPE cleanup with PSA sorbent, derivatization and determination by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The method was validated with recovery studies using organic yogurt spiked at 0.0025, 0.010 and 0.020 mg/kg and the average recovery varied from 88% to 109% with RSDs < 14%. The method showed good linearity and the limits of detection (LOD) for the ML studied ranged from 0.0012 to 0.0017 mg/kg. Limit of quantification (LOQ) was established according to the lower spike level used in the study (0.0025 mg/kg). No residue was detected (>LOQ) amongst the 104 samples analyzed.

INTRODUÇÃO

As avermectinas e milbemecinas são substâncias pertencentes à família das macrolactonas (ML), sendo compostos com característica antiparasitária que possuem um amplo espectro. Assim, elas são utilizadas tanto na saúde humana quanto na saúde animal (Souza et al, 2007). No Brasil, existem cinco compostos registrados para utilização em bovinos (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e moxidectina) como medicamentos antiparasitários. O uso desses produtos de forma inadequada ou incorreta pode resultar em resíduos nos animais e consequentemente nos alimentos.

Recentemente, uma técnica para extração multirresíduos, baseada na descrita por Anastassiades et al (2003), foi introduzido por Kinsella et al (2009) para análise de 38 resíduos de drogas veterinárias, incluindo ML. Consiste em um método eficaz e que pode ser aplicado em vários laboratórios, devido à sua simplicidade, pois não necessita de volumes excessivos de solventes (≤ 10 mL de acetonitrila) e praticamente não utiliza vidrarias. Os extratos obtidos podem ser analisados por cromatografia líquida com a utilização de detectores diversos. Essa técnica é conhecida como QuEChERS (do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) e oferece

diversas vantagens sobre os métodos tradicionais de análise, pois apresenta recuperações elevadas para um grande número de compostos de diversas polaridades e não utiliza solventes clorados (Lehotay et al, 2005).

Para que possamos garantir que as características de desempenho de um método sejam alcançadas e para demonstrar que o procedimento utilizado é apropriado, faz-se necessário a validação da metodologia. Os principais parâmetros utilizados para essa verificação e sugeridos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) são: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão (Thompson et al., 2002; INMETRO, 2007).

O objetivo desse estudo foi validar o método QuEChERS para determinar 5 macrolactonas em iogurtes comercializados na cidade de Campinas, SP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Os padrões de doramectina, ivermectina, moxidectina, abamectina e de eprinomectina 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 10 mg/L levando-se em consideração a pureza. A partir destas foram preparados novas soluções contendo os cinco padrões.

Os sais e solventes de uso comum em laboratório foram de grau analítico e os solventes para cromatografia, grau cromatográfico. O sorbente PSA (amina primária secundária) foi adquirido da empresa Varian®.

Amostras

Foi utilizado nos ensaios de validação de metodologia iogurte orgânico disponível comercialmente em Campinas, produzido a partir de leite proveniente de animais que não receberam as macrolactonas estudadas. Essas amostras foram denominadas “amostra branco”.

Para o monitoramento de resíduos foram adquiridas 104 amostras de iogurte (integral, semi desnatado e desnatado) em supermercados de Campinas entre agosto de 2011 e maio de 2012.

Extração e “clean up”

Foram pesados 10 g de amostra em um tubo de centrífuga de 50 mL e adicionado 1 mL de água e 10 mL de acetonitrila. O tubo foi agitado em vórtex e acrescentou-se 4 g de MgSO₄ anidro e 1 g de NaCl. O tubo foi agitado por 1 minuto e centrifugado 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 MgSO_4 anidro. O tubo foi agitado em “vórtex” por 30 segundos e centrifugado por 2 minutos a 2500 rpm. Do sobrenadante obtido, 550 μL foram retirados, transferidos para tubo de vidro e evaporados até secura sob fluxo de nitrogênio.

Derivatização

Ao extrato obtido no item anterior foram adicionados 200 μL da mistura de 1-metilimidazol:acetonitrila anidra (1:1) e agitou-se em “vortex” por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 300 μL da mistura de anidrido trifluoroacético:acetonitrila anidra (1:2) e agitou-se em “vortex” por 30 segundos. Depois, adicionou-se 50 μL de ácido acético glacial, seguido de agitação em “vortex” por mais 30 segundos. O extrato foi mantido em banho térmico a 65°C por 30 minutos e então filtrado em membrana Millex® com poros de 0,45 μm para injeção em cromatógrafo.

Separação, detecção e quantificação

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu® equipado com bomba modelo LC-20AT, injetor automático SIL 20A e detector de fluorescência RF-10A XL. O cromatógrafo foi controlado pelo “software Shimadzu LCsolution” utilizado para administração do sistema de aquisição e tratamento de dados. A coluna analítica utilizada foi a de fase estacionária de octadecilsilil (C18), (150 x 3.9 mm) de partículas de 4 μm (Waters Nova-pak®) e pré-coluna do mesmo material, mantida em forno com temperatura controlada de 30°C . O volume de injeção foi de 20 μL e os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram de 365 nm e 470 nm, respectivamente. Utilizou-se acetonitrila:metanol:ácido acético 2% (55:40:5) como fase móvel em sistema isocrático, com fluxo de 1,2 mL/min. A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos nas amostras e no padrão.

Validação da metodologia:

Linearidade no solvente e matriz

Foram construídas três curvas de calibração em acetonitrila e em extrato da “amostra branco”. Os níveis foram 0, 0,0025, 0,005, 0,010, 0,015, 0,020, e 0,025 mg/L para todos os endectocidas.

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 conforme recomendado pela RE 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Recuperação – Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de estudos de recuperação em três replicatas independentes para os níveis 0,01 e 0,02 mg/kg e em seis replicatas para o nível 0,0025mg/kg.

Precisão – Repetitividade

A precisão sob condição de repetitividade foi avaliada através de seis ensaios de recuperação, realizados no mesmo dia, em amostra de iogurte orgânico no nível de 0,0025 mg/kg para todos os endectocidas.

Limite de detecção

A estimativa do LD foi calculada segundo a RE 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido pelo menor nível de fortificação onde se obteve exatidão adequada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da metodologia

Os parâmetros de regressão foram estimados pelo Método de Mínimos Quadrados Ordinários. As curvas de calibração foram consideradas apropriadas, uma vez que os coeficientes de correlação linear ficaram entre 0,9967 e 0,9997 (matriz) e entre 0,9994 e 0,9999 (solvente). Esses valores indicam uma linearidade adequada, uma vez que são maiores que o estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003) que é de 0,98.

Os valores médios de recuperação nos três níveis de fortificação para o todos os padrões adicionados às “amostras branco” apresentaram-se dentro de limites aceitáveis (88% a 109%) e com coeficientes de variação abaixo de 14%. O limite de detecção do método foi de 0,0017 mg/kg para eprinomectina, 0,0012 mg/kg para moxidectina, 0,0014 mg/kg para abamectina, 0,0014 mg/kg para doramectina e 0,0013 mg/kg para ivermectina. O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido pelo menor nível de fortificação onde se obteve exatidão adequada, ou seja, 0,0025 mg/kg.

Esses resultados são considerados satisfatórios para determinações de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal e atendem aos critérios de desempenho proposto pela Instrução normativa nº 24 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 14 de julho de 2009 (BRASIL, 2009).

Amostras Analisadas

Não foi detectado ($>LQ$) nenhum resíduo das macrolactonas estudadas nas 104 amostras analisadas. A maioria dos trabalhos publicados na literatura científica tem o enfoque de estudos de depleção de ML (Danaher et al, 2006) e não existe publicação com dados de monitoramento em iogurte comercial, existem apenas poucos trabalhos sobre monitoramento dessas substâncias em leite. No Brasil, o monitoramento realizado pelo MAPA e divulgado na IN 6 de 2011 do Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes mostra que em 2010 das 71 amostras analisadas, nenhuma apresentou irregularidade (BRASIL, 2011).

A ausência de resíduos nas amostras analisadas nos leva a acreditar que os produtores estão respeitando as boas práticas veterinárias e, portanto os consumidores não estarão expostos a riscos de exposição a essas substâncias.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos testes de recuperação, linearidade e limites de detecção e quantificação indicam que a metodologia QuEChERS é adequada e pode ser empregada para análise de 5 macrolactonas em iogurte.

Não foram encontrados resíduos das macrolactonas estudadas ($>LQ$) em nenhuma das amostras analisadas e esse resultado pode indicar que o consumo de iogurte não representa risco à população de Campinas em relação aos 5 compostos estudados.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida (PIBIC/CNPq) e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa (processo 479147/2010-8).

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International** v. 86, n. 2, p.412-430, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Instrução Normativa nº 24**, de 9 de agosto de 2011. Publica o Subprograma de Monitoramento em carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2011, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal PNCRB, instituído pela Portaria MAPA nº 51, de 6 de fevereiro de 1986, na forma do Anexo I à presente Instrução Normativa. Diário Oficial da União, Brasília, 11 ago 2011.

DANAHER, M.; HOWELLS, L.; CROOKS, S. R. H.; FLAJS, V. C.; O'KEEFFE, M.; Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **J. Chromatogr. B** **2006**, *844*, 175.

KINSELLA B, LEHOTAY S J, MASTOVSKA K, LIGHTFIELD AR, FUREY A, DANAHER M. New Method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver sing liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 637, n. 1-2, p. 196-207, 2009.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; & YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e qualidade industrial (Brasil). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Revisão 2. Junho/2007.

SOUZA, S. V. C.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C.; JUNQUEIRA, R. G. In-house validation of a multi-residue method for determining residual avermectin in cow's milk by HPLC coupled with fluorescence detection. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, n.4, p. 819-832, 2007.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v. 74, n.5, p. 835-855, 2002.